

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/85, 5/10, 15/37 C12N 15/34	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/06222 (43) Date de publication internationale: 1er avril 1993 (01.04.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00879 (22) Date de dépôt international: 22 septembre 1992 (22.09.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/11726 24 septembre 1991 (24.09.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : CLAIRE, Michel [FR/FR]; 111, Rue du Faubourg Figuerolles, F-34000 Montpellier (FR). COURAUD, Pierre-Olivier [FR/FR]; 9, rue du Perray, F-78160 Auffargis (FR). DURIEU-TRAUTMANN, Odile [FR/FR]; 26, avenue Dode-de-la-Brunerie, F-75016 Paris (FR). FOIGNANT-CHAVE-ROT, Nathalie [FR/FR]; 10, rue Jeanne d'Arc, F-75013 Paris (FR). ROUX, Françoise [FR/FR]; 27, avenue d'Italie, F-75013 Paris (FR). STROSBERG, Arthur, Donny [BE/FR]; 60, rue de Javel, F-75015 Paris (FR).		(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: IMMORTALIZED CEREBRAL ENDOTHELIAL CELL LINES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND APPLICATIONS THEREOF AS A MODEL FOR THE STUDY OF CEREBRAL PHYSIOPATHOLOGY (54) Titre: LIGNEES DE CELLULES ENDOTHELIALES CEREBRALES IMMORTALISEES AVEC UN ONCOGENE (57) Abstract <p>Immortalized cerebral endothelial cell lines, process for their preparation and applications thereof as a model for the study of cerebral physiopathology and more especially, as a cellular model of the hemato-encephalic barrier. Said lines are obtained by transfection of cerebral endothelial cells by means of a nucleic acid fragment comprising at least one fragment immortalizing a viral or cellular oncogene, optionally associated with at least one marker gene. The lines thus transfected are immortalized and exhibit the non-transformed phenotype of differentiated cerebral endothelial cells.</p> (57) Abrégé <p>Lignées de cellules endothéliales cérébrales immortalisées, leur procédé de préparation et leurs applications en tant que modèle d'étude de la physiopathologie cérébrale et plus particulièrement en tant que modèle cellulaire de la barrière hémato-encéphalique. Lesdites lignées sont obtenues par transfection de cellules endothéliales cérébrales par un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire, éventuellement associé à au moins un gène marqueur et les lignées ainsi transfectées sont immortalisées et présentent le phénotype non transformé de cellules endothéliales cérébrales différenciées.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	MN	Mongolie
AU	Australie	FR	France	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NO	Norvège
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	PT	Portugal
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République centrafricaine	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CH	Suisse	KR	République de Corée	SE	Suède
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TD	Tchad
DE	Allemagne	MG	Madagascar	TG	Togo
DK	Danemark	ML	Mali	UA	Ukraine
ES	Espagne			US	Etats-Unis d'Amérique

LIGNÉES DE CELLULES ENDOTHELIALES CEREBRALES IMMORTALISEES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS EN TANT QUE MODELE D'ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CEREBRALE.

5 La présente invention est relative à des lignées de cellules endothéliales cérébrales immortalisées, à leur procédé de préparation et à leurs applications en tant que modèle d'étude de la physiopathologie cérébrale et plus particulièrement en tant que modèle
10 cellulaire de la barrière hémato-encéphalique.

 La barrière hématoencéphalique contrôle les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral. Elle est essentiellement constituée des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux, associées aux astrocytes
15 périvasculaires. Ces cellules endothéliales présentent un phénotype unique, caractérisé essentiellement par la présence de nombreuses jonctions serrées intercellulaires et l'expression d'enzymes spécifiques, telles que la γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) et la phosphatase alcaline.

20 Il est connu que l'induction de ce phénotype endothélial est contrôlé, *in vivo*, par les astrocytes périvasculaires. L'étude *in vitro* des mécanismes moléculaires de cette induction présente l'inconvénient d'être dépendante de la disponibilité en cultures cellulaires
25 primaires de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux ; de plus, outre la difficulté, à l'heure actuelle, de disposer de systèmes permettant l'analyse des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, la durée de vie limitée de ces cellules en culture
30 (de l'ordre de douze passages) conduisant, de plus, à des changements phénotypiques considérables concomitamment au vieillissement cellulaire (DURIEU-TRAUTMANN et al., J. Neurochem., 1991) est un autre inconvénient majeur lié à cette étude.

35 Les Inventeurs se sont, en conséquence, donné pour but de pourvoir à un modèle d'étude des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, ne pré-

sentant pas les inconvénients des cultures de ces cellules et permettant l'étude des processus neuro- et immuno- chimiques impliqués dans le contrôle de l'activité de la barrière hémato-encéphalique.

5 La présente invention a pour objet des lignées de cellules endothéliales cérébrales de mammifère, caractérisées :

. en ce qu'elles sont immortalisées et présentent au moins l'une des caractéristiques suivantes des cellules
10 endothéliales cérébrales différenciées, de manière stable :

- l'expression de marqueurs endothéliaux tels que l'antigène apparenté au facteur VIII, l'enzyme de conversion de l'angiotensine et des enzymes spécifiques
15 (γ -GT, phosphatase alcaline),

- la sécrétion de substances vasoactives (endothéline, NO, prostaglandines),

- l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH),

20 - l'expression de récepteurs hormonaux (récepteurs de neurotransmetteurs tels que les récepteurs β -adrénergiques), et

- l'existence de jonctions serrées et

. en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par
25 transfection de cellules endothéliales cérébrales par un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire, éventuellement associé à au moins un gène marqueur.

De telles lignées cellulaires présentent, de
30 manière surprenante, au moins l'une des propriétés précitées des cellules endothéliales cérébrales différenciées, et ce, de manière stable.

Conformément à l'invention, ledit gène marqueur est avantageusement un gène codant pour la résistance à un antibiotique.
35

Selon un mode de réalisation avantageux de la-

dite lignée, elle est obtenue par transfection de cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins par le plasmide pSV3 néo contenant le gène néo de la résistance à la néomycine et un fragment de l'oncogène T de SV40.

Le plasmide pSV3 néo est plus particulièrement décrit dans l'article au nom de Southern et Berg, (J. Mol. Appl. Genet., 1982, 1, 327-341).

Cette lignée cellulaire a été dénommée SV-BEC par les Inventeurs.

Conformément à l'invention, ladite lignée a été déposée sous le n° I-1143 en date du 19 septembre 1991 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite lignée, elle est obtenue par transfection de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de rat par un plasmide contenant la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine.

Cette lignée cellulaire a été dénommée RBE-4 par les Inventeurs.

Conformément à l'invention, ladite lignée a été déposée sous le n° I-1142 en date du 19 septembre 1991 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

Ledit fragment oncogène viral ou cellulaire et/ou le gène marqueur sont sous le contrôle soit d'un promoteur homologue, soit d'un promoteur hétérologue, aptes à permettre l'expression dudit fragment immortalisant.

De manière inattendue, lesdites lignées sont immortelles, présentent un phénotype stable et non transformé de cellules endothéliales cérébrales différenciées, possèdent une activité de prolifération illimitée et présentent certaines des propriétés des cellules endothé-

liales cérébrales de la barrière hémato-encéphalique, permettant notamment leur utilisation comme modèle cellulaire *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique.

La présente invention a également pour objet
5 un procédé d'obtention d'une lignée cellulaire conforme à l'invention par une méthode de transfection, lequel procédé est caractérisé en ce que :

. on cultive des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux dans un milieu de culture convenable, supplémenté en sérum et en facteur de croissance,
10

. on les transfecte entre le 2ème et le 6ème passage avec un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire et éventuellement au moins un gène marqueur,
15 notamment un gène codant pour la résistance à un antibiotique et

. on sélectionne les cellules transfectées sur un milieu de sélection adapté audit gène marqueur, si nécessaire.

20 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du dit procédé, ledit fragment nucléique comprend un gène codant pour la résistance à la néomycine et un fragment d'un oncogène viral, tels qu'un fragment de l'oncogène T de SV40 et un fragment contenant la région précoce E1A du
25 génome de l'adénovirus 2 ou d'un oncogène cellulaire.

La présente invention a également pour objet un modèle d'étude et d'identification des systèmes biochimiques et cellulaires de la barrière hémato-encéphalique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une lignée cellulaire selon l'invention.
30

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, avec référence aux dessins annexés dans
35 lesquels les figures 1 à 7 illustrent les propriétés des

cellules SV-BEC et les figures 8 à 14 illustrent les propriétés des cellules RBE-4.

De manière plus précise :

- les figures 1A et 1B illustrent l'effet du
5 FGFb sur la prolifération des cellules SV-BEC (figure 1A) et des cellules CECB (figure 1B),
- les figures 2A et 2B illustrent l'effet de quantités croissantes de FGFb sur les cellules SV-BEC (figure 2A) et des cellules CECB (figure 2B),
- 10 - les figures 3 montrent que les cellules SV-BEC sont des cellules endothéliales différenciées (figure 3A : présence d'enzyme de conversion de l'angiotensine ; figure 3B : présence d'antigène apparenté au facteur VIII ; figure 3C : immunocoloration avec l'agglutinine
15 *Griffonia simplicifolia*,
- la figure 4 montre que les cellules SV-BEC sécrètent de l'endothéline-1,
- la figure 5 illustre une coupe verticale d'une monocouche confluyente de cellules SV-BEC, en
20 microscopie électronique,
- la figure 6 montre le nombre de sites de liaison β -adrénergiques présents à la surface des cellules SV-BEC,
- les figures 7A et 7B illustrent l'effet de
25 l'isoprotérénol et d'un antagoniste sur la quantité d'AMPC dans les cellules SV-BEC,
- la figure 8 montre la structure du plasmide servant à la transfection des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de rat, pour l'obtention de la
30 lignée immortalisée RBE-4,
- les figures 9A et 9B illustrent certaines des caractéristiques du phénotype endothélial différencié des cellules RBE-4 immortalisées : expression d'un antigène apparenté au facteur apparenté au facteur VIII
35 (figure 9A) et coloration par la lectine *Bandeiraea simplicifolia* (figure 9B),

- Les figures 9C à 9F montrent la localisation histochemique de γ -GT, en présence de FGFb dans des cellules RBE-4 immortalisées,

5 - Les figures 10A-F montrent la localisation histochemique de la phosphatase alcaline, en l'absence (figures 10A-B) ou en présence (figures 10C-F) de FGFb,

- Les figures 11 et 12 illustrent la synthèse d'AMPC (figure 11) et de GMPc (figure 12) par les cellules RBE-4,

10 - la figure 13 illustre la sécrétion d'ET-1 par les cellules RBE-4, et

- la figure 14 illustre l'expression des molécules de classe I et de classe II du CMH dans les cellules RBE-4.

15 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Préparation d'une lignée cellulaire conforme
20 à l'invention : cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux bovins (lignée SV-BEC).

Des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux bovins sont isolées à partir du cortex cérébral traité à la collagénase (DURIEU-TRAUTMANN et al., J.
25 Neurochem., 1991, 56, 3, 775-781) ; ces cellules ne sont pas contaminées par des cellules vasculaires de muscle lisse ou des péricytes. Elles sont mises en culture dans des boîtes recouvertes de gélatine à 0,2 % (p/v) contenant un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)
30 supplémenté en sérum bovin fœtal à 10 % (v/v), en glutamine 2 mM et en FGFb à 1 ng/ml et du glucose à 1 g/l.

Elles sont soumises à un passage hebdomadaire réalisé par resuspension dans de la trypsine-EDTA [0,05 %-0,02 % (p/v)] à 1 à 10 dilutions ; le milieu est
35 changé tous les 3 jours.

La technique de coprécipitation au phosphate

de calcium est utilisée pour la transfection desdites cellules, au 5ème passage, avec le plasmide pSV3 néo (10 µg), contenant un fragment de l'oncogène SV40 et le gène de résistance néo au médicament dénommé G418 (WHITLEY et al., Mol. Cell. Endocrinol., 1987, 52, 279-284).

Après sélection dans un milieu contenant 800 µg/ml de G418, les cellules présentes sont clonées par dilution limite.

On obtient ainsi le clone SV-BEC.

EXEMPLE 2 : Caractéristiques de la lignée SV-BEC.

La lignée cellulaire obtenue à l'exemple 1 possède un certain nombre des caractéristiques des cellules endothéliales cérébrales.

A. Phénotype endothélial différencié :

a) Besoins en FGFb et en gélatine des cellules SV-BEC immortalisées :

Lorsque les cellules sont ensemencées à faible densité ($5 \cdot 10^3$ cellules/cm²) dans des boîtes de culture de tissus et cultivées sur un milieu supplémenté en sérum, [DMEM supplémenté en sérum bovin fœtal (10 %) et glutamine (2 mM)], les cellules endothéliales cérébrales bovines (CECB) prolifèrent à faible taux, tandis que les SV-BEC arrêtent de proliférer après 3-4 jours en culture.

Les figures 1A et 1B, qui comportent en abscisse le nombre de jours et en ordonnées le nombre de cellules/cm² ($\times 10^{-3}$), illustrent l'effet du FGFb sur la prolifération des cellules SV-BEC (figure 1A) et des cellules CECB (figure 1B). L'addition de FGFb (1 ng/ml) (figure 1A, courbe -■- et figure 1B, courbe -▲-), améliore de manière importante le taux de croissance des deux types cellulaires.

La confluence est atteinte après 5 jours, après addition de FGFb chaque jour.

. La densité cellulaire maximale obtenue avec

les cellules SV-BEC, dans ces conditions, est seulement de 65 à 70 % de la densité obtenue avec les cellules CECB. Les taux de croissance des deux types cellulaires sont similaires, avec un temps de doublement de la population d'environ 12 heures, pendant la phase logarithmique.

. Les figures 2A et 2B, qui comportent en abscisses les concentrations en FGFb et en ordonnées le nombre de cellules/cm² ($\times 10^{-3}$) illustrent l'effet de quantités croissantes de FGFb sur les cellules SV-BEC (figure 2A) et sur les cellules CECB (figure 2B) en présence ou en l'absence de gélatine. La concentration de FGFb nécessaire pour une prolifération cellulaire optimale, est de 0,25 ng/ml pour les cellules SV-BEC (figure 2A : boîtes de culture recouvertes de gélatine : courbe ■ ; boîtes sans gélatine : courbe □) et de 0,5 ng/ml pour les cellules CECB (figure 2B : boîtes de culture recouvertes de gélatine : courbe ▲ ; boîtes sans gélatine : courbe □). Dans l'essai illustré aux figures 2A et 2B, le FGFb est ajouté au jour 0 et au jour 3.

Les réponses prolifératives des deux types cellulaires sont significativement améliorées lorsque les cellules sontensemencées sur des boîtes de culture recouvertes de gélatine. A confluence, les cellules SV-BEC forment une monocouche de cellules, inhibées par contact.

b) Immunochimie :

Par analyse immunocytochimique, il apparaît que les cellules SV-BEC expriment un antigène apparenté au facteur VIII ainsi que l'enzyme de conversion de l'angiotensine, deux marqueurs spécifiques des cellules endothéliales.

De plus, ces cellules sont colorées par l'agglutinine *Griffonia simplicifolia* (Sigma) fluorescente, qui est également un marqueur spécifique des cellules endothéliales cérébrales.

Pour ces trois tests, les cellules ont été

cultivées sur des lamelles de couverture recouvertes de gélatine. Elles sont fixées avec un mélange méthanol : éthanol (1:1) à 22°C pendant 20 min, ces cellules sont d'abord incubées avec des anticorps dirigés contre
5 l'antigène apparenté au facteur VIII ou l'enzyme de conversion de l'angiotensine, puis avec des anticorps biotynilés et finalement elles sont colorées à la streptavidine fluorescente. Ces résultats sont observés à l'aide d'un microscope standard (Nikon) équipé avec une
10 illumination en épifluorescence.

L'agglutinine *Griffonia simplicifolia*, marquée à la fluorescéine est utilisée au 1/400 dans un tampon PBS.

Toutes les incubations sont de 60 minutes à
15 température ambiante.

Les cellules SV-BEC sont donc de vraies cellules endothéliales différenciées, comme le montrent la présence d'antigène apparenté au facteur VIII (figure 3B), d'enzyme de conversion de l'angiotensine (figure 3A)
20 et l'immunocoloration avec l'agglutinine *Griffonia simplicifolia* (figure 3C).

c) Sécrétion de substances vasoactives :

Les cellules SV-BEC sont également testées pour la synthèse et la sécrétion de substances vaso-actives, en comparaison avec les cellules CECB. En utilisant un radioimmunoessai, on détecte une immunoréactivité apparentée à celle de l'endothéline-1 dans un milieu conditionné (figure 4). Les courbes de dilution générées par ces milieux conditionnés sont parallèles à la courbe
25 standard obtenue avec l'endothéline-1 (ET-1). De plus, la sécrétion observée est linéaire en fonction du temps et atteint un plateau au bout de 24 heures.
30

Le protocole du RIA est le suivant :

un antisérum de lapin spécifique de l'endothéline (dilution finale de 1/300) est incubé dans du DMEM supplémenté en sérum bovin fœtal (10 %), en présence
5 de différentes concentrations d'endothéline non marquée synthétique ou de milieu conditionné, pendant 2 heures à 37°C (volume final : 80 µl).

De l' [¹²⁵I]ET-1 (10 000 cpm dans 40 µl) est alors ajoutée et l'incubation est de 16 heures à 4°C.
10 L' [¹²⁵I]ET-1 libre et liée sont séparées par addition de Protéine A-Sépharose®.

Après 1 heure à température ambiante, les tubes sont centrifugés, les culots lavés avec un tampon et la radioactivité liée est comptée.

15 La figure 4 illustre les résultats d'un tel essai et comporte en abscisse la concentration en endothéline-1 (log fmol/tube) et en ordonnées le rapport lié/libre (%). Les milieux conditionnés obtenus à partir de SV-BEC (courbe -■-) et à partir de CEBC (courbe -▲-) sont comparées avec la courbe standard (courbe -O-).
20

B. Absence de tumorigénicité :

Les cellules SV-BEC ne sont pas transformées : en effet, comme précisé ci-dessus, elles présentent une inhibition de contact et leur prolifération est dépendante du FGFb exogène.
25

C. Expression des marqueurs de la barrière hémato-encéphalique :

- Le protocole utilisé est le suivant :

Les cellules sont rincées avec un tampon PBS
30 froid, pH 7,4, puis fixées dans du glutaraldéhyde 2 % (v/v) dans un tampon cacodylate 0,1 M, pendant 60 min à 4°C. Après un rinçage rapide dans le même tampon, les cellules sont à nouveau fixées, soit dans du ferro-osmium [OsO₄ 1%, K₄Fe(CN)₆ 0,8 %] dans un tampon cacodylate pendant 30 min, soit dans de l'OsO₄ aqueux 1 % et de l'acétate d'uranyle 1 % dans de l'éthanol 50 %.
35

Ces cellules sont ensuite déshydratées dans de l'éthanol puis retirées des boîtes de culture à l'aide d'un traitement court avec du butyl-2-3-époxy-propyl-éther.

5 Les monocouches sont soigneusement récupérées et transférées sur de petites capsules de polyéthylène et incluses dans un mélange EPON[®], en utilisant de l'époxy-1-2-propane comme solvant intermédiaire.

10 De fines sections sont colorées de manière conventionnelle avec du citrate de plomb et de l'acétate d'uranyle et observées dans un appareil Philipps CM12 à 80 kv.

- Résultats :

15 La morphologie ultrastructurale des cellules SV-BEC est observée au microscope électronique.

La figure 5 illustre une coupe verticale d'une monocouche confluyente ; de nombreuses jonctions serrées intercellulaires sont visibles (voir les flèches), caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique.

20 De plus, une activité γ -glutamyl transférase significative est mesurée dans les cellules confluentes SV-BEC ($11,2 \text{ nmol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$), également spécifique de la barrière hémato-encéphalique, selon le protocole de mesure de l'activité γ -glutamyl transpeptidase décrit dans
25 ORLOWSKI et MEISTER (Proc. Natl. Acad. Sci., 1970, 67, 1248-1255).

D. Coexpression des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques :

* Liaison aux récepteurs.

- Protocole :

30 . Pour la mesure de la liaison des ligands β -adrénergiques, les cellules sont détachées après un court traitement à la trypsine-EDTA, lavées et remises en suspension (environ 10^7 cellules/ml) dans une solution salée de Hank supplémentée avec de l'HEPES 20 mM, pH 7,4 et de
35 la sérumbalbumine bovine (1 mg/ml).

Les cellules (10^6) sont incubées dans le tam-

pon avec des quantités croissantes de [^3H] CGP 12177, dans un volume final de 300 μl à 37°C pendant 60 min.

La liaison non spécifique est mesurée en présence de (\pm) alprénolol $3 \cdot 10^{-5}$ M. La réaction est arrêtée
5 par addition d'1 ml de tampon froid, et les échantillons sont immédiatement filtrés sur des filtres en fibre de verre GF/C (Whatman). Après lavages, la radioactivité retenue sur les filtres est comptée par scintillation liquide.

10 - Résultats :

La liaison du [^3H] CGP 12177, un antagoniste β -adrénergique hydrophile, est utilisée pour évaluer le nombre de sites de liaison β -adrénergiques présents à la surface des cellules SV-BEC. Une analyse Scatchard des
15 données de liaison à saturation indiquent 3819 ± 229 sites/cellule et une constante de dissociation (K_D) de 899 ± 113 pM (figure 6).

La figure 6 comporte en abscisse la concentration en [^3H] CGP 12177, en nM et en ordonnée la quantité
20 liée en fpmol/ 10^6 cellules.

* Couplage des récepteurs à l'activité adénylate cyclase : accumulation d'AMPC cellulaire.

 - Protocole :

Des aliquots de 10^6 cellules sont incubés dans
25 un tampon (solution salée de Hank, HEPES 20 mM, pH 7,4, IBMX (3-isobutyl-1-méthyl-xanthine) 0,5 mM) avec des quantités croissantes de (-)isoprotérénol dans un volume final de 200 μl à 37°C pendant 10 min.

L'inhibition de l'accumulation d'AMPC cellulaire est testée avec de l'(-)isoprotérénol $3 \cdot 10^{-8}$, en
30 présence de différentes concentrations de ligand CGP 2071A adrénérergique β_1 -sélectif. Le contenu en AMPC est mesuré comme décrit dans CHAPOT et al. (Hybridoma, 1989, 8, 535-543), en utilisant le kit Amersham
35 [^3H] cAMP.

- Résultats :

La figure 7A montre que l'(-)isoprotérénol induit une augmentation du taux d'AMPC d'un facteur 6.

Ces données indiquent une valeur de l'EC₅₀ de 5 nM pour l'(-)isoprotérénol. Une inhibition biphasique de l'effet de l'(-)isoprotérénol est observée en présence de CGP 20712A, suggérant l'existence de deux populations de récepteurs β -adrénergiques comme dans les cellules endothéliales d'origine (figure 7B).

10 Une analyse informatique de ces données révèle que 36 % des récepteurs ont une affinité importante pour le CGP 20712A (IC₅₀ \approx 29 pM) et que 65 % ont une faible affinité (IC₅₀ \approx 1 nM). Ces valeurs sont en accord avec les affinités connues du CGP 20712A pour les récepteurs
15 β 1 et β 2 adrénergiques (MARULLO et al., Bio/Technology, 1989, 7, 923-927).

La figure 7A, qui comporte en abscisse la concentration en (-)isoprotérénol (log M) et en ordonnées la quantité de pmol d'AMPC/10⁶ cellules, illustre l'effet
20 de l'isoprotérénol sur la quantité d'AMPC dans les cellules SV-BEC et la figure 7B, qui comporte en abscisse la concentration en CGP 20712A (log M) et en ordonnée le pourcentage d'AMPC accumulé, illustre l'inhibition de cet effet par le CGP 20712A.

25 EXEMPLE 3 : Préparation d'une lignée cellulaire conforme à l'invention : cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de rat Lewis (lignée RBE-4).

- Des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de rat Lewis sont immortalisées par transfection
30 tion avec un plasmide contenant la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine sous contrôle du promoteur SV40 (figure 8), selon la même technique que celle de l'exemple 1, après mise en culture de ces cellules dans des boîtes recouvertes de collagène, contenant un milieu α -MEM/F10 (2/3 ;
35 1/3), supplémenté en sérum de veau foetal à 10 %, en FGFb

1 ng/ml, en glutamine et en pénicilline/streptomycine.

EXEMPLE 4 : Caractéristiques de la lignée RBE-4.

La lignée cellulaire obtenue à l'exemple 3 possède certaines des caractéristiques des cellules endothéliales cérébrales, étudiées selon les mêmes protocoles que ceux de l'exemple 2 ; elle possède notamment un phénotype non-transformé : inhibition de contact, prolifération dépendant des facteurs de croissance et d'adhérence, expression de marqueurs de différenciation endothéliale et non-tumorigénicité.

A. Phénotype endothélial différencié :

Les cellules RBE-4 expriment un antigène apparenté au facteur apparenté au facteur VIII (figure 9A) ; de plus, ces cellules sont colorées par la lectine *Bandeiraea simplicifolia* (figure 9B) ; le protocole utilisé est le même que celui de l'exemple 2 et les résultats montrent bien que les cellules RBE-4 sont des cellules endothéliales différenciées.

B. Expression de marqueurs de la barrière hémato-encéphalique :

Les activités de deux enzymes, qui sont considérées comme des marqueurs des cellules endothéliales différenciées des microvaisseaux cérébraux, la γ -glutamyl-transférase (γ -GT) et la phosphatase alcaline, sont mises en évidence dans les cellules RBE-4, à l'aide de méthodes histochimiques.

Des cellules RBE-4 sont ensemencées dans des boîtes de culture de tissus et cultivées dans un milieu contenant du FGFb [α Medium/Ham's F10 (1:1 Seromed, France), supplémenté avec de la glutamine 2 mM, du sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur à 10 % et du FGFb 1 ng/ml ; puis elles sont étalées à une densité de 10^4 cellules/cm² sur des boîtes recouvertes de collagène]. Les cultures confluentes développent, après plusieurs jours, des ramifications qui s'étendent au delà de la monocouche et forment un réseau de structures tubulaires,

rappelant des capillaires (figure 9C). Des activités γ -GT (figure 9C) et phosphatase alcaline peuvent être détectées dans quelques unes de ces structures tubulaires, mais ne sont pas observées dans les cellules de la monocouche environnante.

Les cellules RBE-4 sont cocultivées avec un milieu conditionné ou des membranes plasmiques soit de cellules astrogliales primaires de rat (figure 9D), soit de cellules gliomales C6 (figure 9E). Dans des monocouches traitées avec des membranes plasmiques des deux types précités, en présence ou non de FGFb, les structures tubulaires se développent rapidement et forment des agrégats informes importants ; une telle prolifération apparaît moins évidente en milieu conditionné. Les activités γ -GT (figure 9F) et phosphatase alcaline (figure 10A-F) se rencontrent dans de nombreuses cellules de ces structures tri-dimensionnelles, entraînant une augmentation globale de ces deux marqueurs de la BHE dans les cocultures. L'addition d'un analogue de l'AMPc, le 8-bromo-AMPc, réduit ce processus angiogénique et induit l'expression d'une activité phosphatase alcaline dans chacune des cellules formant les structures tubulaires résiduelles ou les agrégats et dans quelques cellules de la monocouche. Les effets de cette substance sur la γ -GT sont moins prononcés.

Les figures 9C à 9F montrent la localisation histochemique de γ -GT, en présence de FGFb (un trait correspond à 60 μ m) : 9C : cellules RBE-4 à confluence, avec une structure de type capillaire et la présence de quelques cellules γ -GT + ; 9D : cellules RBE-4 traitées pendant 6 jours avec des membranes plasmiques d'astrocytes primaires ; 9E cellules RBE-4 traitées pendant 6 jours avec des membranes plasmiques de cellules gliomales C6 ; 9F : cellules RBE-4 traitées pendant 6 jours avec des membranes plasmiques de cellules gliomales C6 et du 8-bromo-AMPc 0,1 mM : la plupart des cellules pré-

sentent une activité γ -GT.

Les figures 10A-F montrent la localisation histochemique de la phosphatase alcaline, en l'absence (figures 10A-B) ou en présence (figures 10C-F) de FGFb :
5 figures 10A et C : cellules RBE-4 à confluence ; figures 10B et D : cellules RBE-4 traitées pendant 6 jours avec des membranes plasmiques de cellules gliomales C6 ; figure 10E : cellules RBE-4 traitées pendant 10 jours avec un milieu conditionné pour cellules gliomales C6 : figure
10 10F : cellules en outre traitées avec du 8-bromo-AMPC 0,1 mM. Ces différentes figures montrent que l'expression de l'activité phosphatase alcaline présente la même évolution en coculture et en présence de 8-bromo-AMPC que la γ -GT.

15 Ces différents résultats montrent que dans les monocouches de cellules endothéliales du clone RBE-4, comme dans les cultures primaires de cellules endothéliales microvasculaires, la formation de tubes capillaires peut se produire, en présence d'un mitogène angiogénique soluble ; de plus, la formation d'une telle
20 structure tubulaire peut être stimulée par des facteurs astrogliaux (membranaires ou solubles).

C - Expression de récepteurs hormonaux.

. production d'AMPC :

25 Des aliquots de $4 \cdot 10^6$ cellules sont incubées dans un tampon A [solution saline de Hank, Hepes 20 mM pH 7,4, IBMX 0,5 mM] en présence de quantités croissantes de (-)-isoprotérénol, dans un volume final de 250 μ l, à 37°C et pendant 10 minutes ; l'AMPC est mesuré comme
30 décrit dans DURIEU-TRAUTMANN O. et al. (J. Neurochem., 1991, 56, 775-781), en utilisant un kit AMPC Amersham [3 H].

Les cellules RBE-4 ont été testées pour leur capacité à produire l'AMPC sous l'influence d'un signal
35 de régulation extracellulaire ; la figure 11, qui comporte en abscisse la concentration en isoprotérénol et en

ordonnée la concentration en AMPc (pmol/10⁵ cellules), montre que l'isoprotérénol, un agoniste β -adrénergique, stimule l'accumulation d'AMPc dans les cellules RBE-4, cette stimulation étant bloquée par le propranolol.

5 . production de GMPc :

Des aliquots de 2.10⁵ cellules sont incubées dans le même tampon A que précédemment, en présence de quantités croissantes de peptides natriurétiques (ANP) dans un volume final de 500 μ l à 37°C, pendant
10 10 minutes.

Lorsqu'on teste l'activité guanylyl cyclase soluble, des aliquots de 10⁶ cellules sont incubées dans le tampon A contenant du nitroprusside à 37°C, pendant 5 minutes.

15 La production de GMPc, à partir de GTP, est catalysée par différentes enzymes : la figure 12, qui comporte en abscisse la concentration en ANP et en ordonnée la concentration en GMPc (pmol/10⁵ cellules), montre que le facteur atrial natriurétique (FAN ou ANP pour
20 *atrial natriuretic peptide*) stimule l'accumulation de GMPc dans les cellules RBE-4.

Ceci montre que les cellules immortalisées conformes à l'invention, RBE-4 possèdent des récepteurs β -adrénergiques et des récepteurs FAN.

25 D - Sécrétion de substances vasoactives.

. sécrétion d'endothéline-1 (ET-1) :

Les cellules RBE-4 sont cultivées dans des boîtes contenant 24 puits, pendant 3 jours.

Le milieu est alors changé et remplacé par
30 500 μ l de milieu dépourvu de sérum contenant de la SAB 0,15 % et différents effecteurs aux concentrations indiquées ci-après.

L'incubation dure de 30 min à 6 h. Les taux d'ET-1 dans les surnageants de culture sont déterminés
35 par EIA, basé sur l'utilisation d'un tandem d'anticorps monoclonaux dirigés contre deux épitopes différents de

l'ET-1 (sensibilité de l'essai, de l'ordre du pg/ml) ; l'accumulation d'ET-1 dans le milieu extracellulaire est linéaire sur une période de 6-8 heures (110 ± 4 pg/ 10^6 cellules/h, à confluence) (figure 13), puis atteint un plateau vers la 16ème heure. Cette sécrétion est stimulée par le sérum et la thrombine ; de plus, le 8-bromo-AMPC (0,5mM) induit une forte libération d'ET-1, tandis que le 8-bromo-GMPc (0,5mM) et le FAN (100 nM) inhibent cette sécrétion.

La figure 13 met en valeur ces résultats, obtenus dans les conditions précitées :

en présence de : 1 : rien ; 2 : 8-bromo-AMPC 0,5 mM ; 3 : IBMX 0,5 mM et 8-bromo-AMPC 0,5 mM ; 4 : isoprotérénol 100 μ M ; 5 : 8-bromo-GMPc 0,5 mM ; 6 : FAN 100 nM et 7 : IBMX 0,5 mM. Après ces traitements, on mesure l'immunoréactivité ET-1 dans les surnageants. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm SEM de 8 à 16 déterminations ($p < 0,01$ pour les colonnes 2 à 6).

. sécrétion de NO :

Le NO, identifié comme facteur relaxant de l'endothélium, est synthétisé à partir de L-arginine par au moins deux NO synthases différentes (la première : dépendante du calcium et de la calmoduline et exprimée, de manière constitutive, seulement dans un petit nombre de types cellulaires, incluant quelques neurones ; la deuxième : inductible par les cytokines).

Des cellules RBE-4 sont cultivées dans des boîtes à 24 puits, pendant 3 jours.

Elles sont ensuite stimulées par l'addition de 100 U/ml d'IFN- γ de rat et/ou de 50 U/ml de TNF α humain, en présence ou en l'absence des différents effecteurs mentionnés ci-après : N-méthylarginine (NMA), nitro-arginine (NOA), cycloheximide (CHX), 8-bromo-AMPC (BrAMPC) ou isoprotérénol (ISO).

Le tableau I ci-après montre la régulation de l'activité NO synthase inductible dans les cellules RBE-

4.

	Traitement	Accumulation de nitrite (μM)
	Aucun	<0,5
	IFN	$3,1 \pm 0,1$
5	TFN	<0,5
	ISO (100 μM)	<0,5
	TFN+IFN	$10,0 \pm 0,1$
	TFN+IFN+NMA (100 μM)	$1,7 \pm 0,1$
	TFN+IFN+NOA (100 μM)	$7,6 \pm 0,4$
10	TNF+IFN+CHX (0,5 $\mu\text{g/ml}$)	$1,2 \pm 0,2$
	IFN+Br-AMPc (500 μM)	$3,8 \pm 0,1$
	TNF+IFN+Br-AMPc (500 μM)	$15,0 \pm 0,4$
	IFN+ISO (10 μM)	$3,9 \pm 0,1$
	IFN+ISO (100 μM)	$4,2 \pm 0,1$
15	TNF+IFN+ISO (100 μM)	$14,8 \pm 0,7$

La libération de NO par les cellules RBE-4 est détectée par détermination colorimétrique des nitrites accumulées, après 48 h, en ajoutant 500 μl de surnageant cellulaire à 500 μl de réactif de Greiss (sulfanilamide 20 0,5 % et dihydrochlorure de naphthyléthylènediamine 0,05 %, dans de l'acide phosphorique 5 %), puis en incubant 10 min à température ambiante. La DO_{540} est mesurée avec un spectrophotomètre. Comme le montre le tableau I, seule la NO synthase inductible est détectable dans les 25 cellules RBE-4. La production de nitrites par les cellules RBE-4 est induite par un traitement avec l'IFN- γ et le TNF α potentialise cet effet. Cette activité est bloquée par la N-méthyl-arginine et d'une moindre manière par la nitro-arginine. Ceci montre l'absence d'expression 30 de la NO synthase constitutive par ces cellules, ce qui constituerait une caractéristique particulière des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique.

Le tableau I montre également que le BrAMPc, quoique n'ayant aucun effet seul, potentialise l'effet 35 inducteur des cytokines.

L'isoprotérénol stimule l'effet inducteur de l'IFN- γ et du TNF α , bien que sans effet seul.

L'activité de l'isoprotérénol est dépendante de la dose et simule celle du 8-Br-AMPC.

5 L'activation de la synthèse de NO est précédée d'une lag-phase de 7-8 h.

. sécrétion de prostaglandines :

Les cellules RBE-4 sécrètent de manière constitutive des quantités importantes de PGE₂ (> 1000
10 pg/ml), mais pratiquement pas de 6-céto-PGF_{1 α} , le dérivé stable de la PGI₂ (< 50 pg/ml).

E - Expression de molécules du complexe majeur d'histo-compatibilité.

15 L'expression de molécules de classe I et de classe II, dans les cellules RBE-4, a été étudiée.

Par analyse en cytométrie de flux dans des conditions standard, les cellules RBE-4 expriment de manière constitutive, des molécules de classe I uniquement. Une analyse après un traitement avec de l'IFN- γ , révèle
20 que l'expression des molécules de classe I est augmentée ; elle révèle également une induction importante de l'expression des molécules de classe II (figure 14 : intensité de fluorescence en abscisse, nombre de cellules, en ordonnée) : l'expression maximale des molé-
25 cules de classe I est observée après 16 heures et reste stable pendant plusieurs heures, tandis que 24 heures de traitement sont nécessaires pour obtenir une expression optimale des molécules de classe II.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède,
30 l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter
35 ter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

No de la demande internationale: PCT/

/

MICRO-ORGANISMES		
Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 3 ligne 12 de la description 1		
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :		
D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/>		
Nom de l'institution de dépôt :		
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes		
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :		
28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15		
Date du dépôt :	N° d'ordre :	
19 septembre 1991	I-1143	
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>		
<p>"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".</p>		
C. ÉTATS DESIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)		
EUROPE CANADA JAPON ETATS-UNIS D'AMERIQUE		
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT : (à ne remplir que si nécessaire)		
Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international ¹ (spécifier la nature générale des indications p. ex., «No d'ordre du dépôt»)		
E. <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)		
(Fonctionnaire autorisé) E. DEMARCO <input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international ¹		
(Fonctionnaire autorisé) 22 SEP. 1992		

No de la demande internationale: PCT/

/

MICRO-ORGANISMES		
Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 3, ligne 24 de la description 1		
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT 1		
D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire 2 <input type="checkbox"/>		
Nom de l'institution de dépôt 4		
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes		
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) 4		
28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15		
Date du dépôt 4	N° d'ordre 4	
19 septembre 1991	I-1142	
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES 1 (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>		
<p>"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".</p>		
C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES 1 (si ces indications ne sont pas données pour tous les États désignés)		
EUROPE CANADA JAPON ETATS-UNIS D'AMERIQUE		
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT 1 (à ne remplir que si nécessaire)		
Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international 1 (spécifier la nature générale des indications p. ex., «N° d'ordre du dépôt»)		
E. <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office receveur)		
(Fonctionnaire autorisé) E. DEMARCO <input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international 1 22 SEP 1992 (Fonctionnaire autorisé)		

REVENDICATIONS

1') Lignées de cellules endothéliales cérébrales de mammifère, caractérisées :

en ce qu'elles sont immortalisées et présentent au moins l'une des caractéristiques suivantes des cellules endothéliales cérébrales différenciées, de manière stable :

- l'expression de marqueurs endothéliaux,
- la sécrétion de substances vasoactives,
- 10 - l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH),
- l'expression de récepteurs hormonaux, et
- l'existence de jonctions serrées et

en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par transfection de cellules endothéliales cérébrales par un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire, éventuellement associé à au moins un gène marqueur.

2') Lignée cellulaire selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par transfection de cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins par le plasmide pSV3 néo contenant le gène néo de la résistance à la néomycine et un fragment de l'oncogène T de SV40.

25 3') Lignée cellulaire selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a été déposée sous le n° I-1143 en date du 19 septembre 1991 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

30 4') Lignée cellulaire selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par transfection de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de rat par un plasmide contenant la région précoce ElA du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine.

5') Lignée cellulaire selon la revendication

4, caractérisée en ce qu'elle a été déposée sous le n° I-1142 en date du 19 septembre 1991 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

5 6') Procédé d'obtention d'une lignée cellulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, par une méthode de transfection, lequel procédé est caractérisé en ce que :

10 . on cultive des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux dans un milieu de culture convenable, supplémenté en sérum et en facteur de croissance,

15 . on les transfecte entre le 2ème et le 6ème passage avec un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire et éventuellement au moins un gène marqueur, notamment un gène codant pour la résistance à un antibiotique et

20 . on sélectionne les cellules transfectées sur un milieu de sélection adapté audit gène marqueur, si nécessaire.

7') Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit fragment nucléique comprend un gène codant pour la résistance à la néomycine et un fragment d'un oncogène viral ou cellulaire.

25 8') Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le fragment d'oncogène viral est choisi dans le groupe qui comprend des fragments d'oncogène T de SV40 et des fragments contenant la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2.

30 9') Modèle d'étude et d'identification des systèmes biochimiques et cellulaires de la barrière hémato-encéphalique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une lignée cellulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

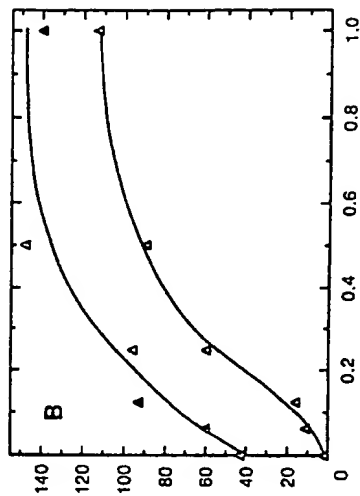
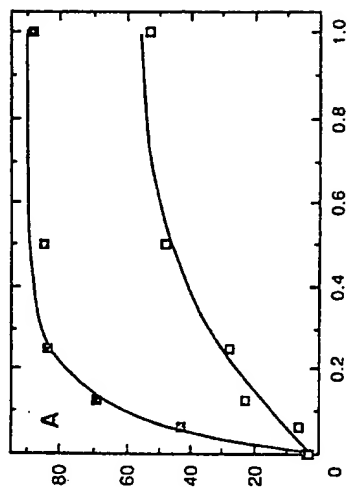


FIGURE 2

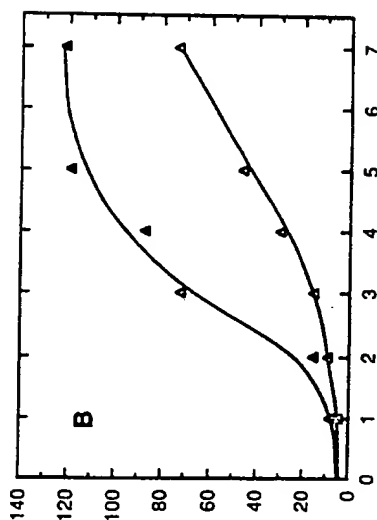
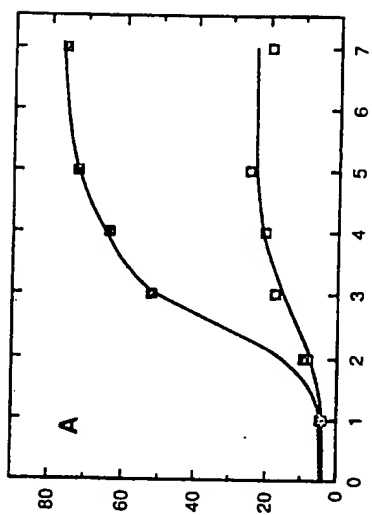


FIGURE 1

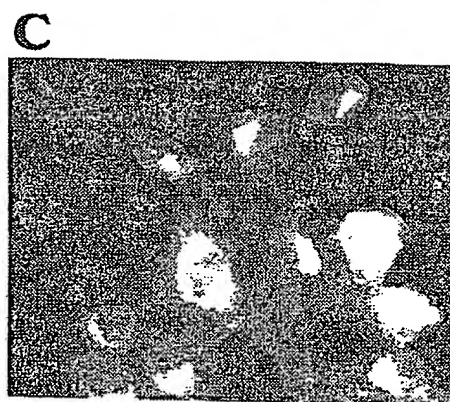
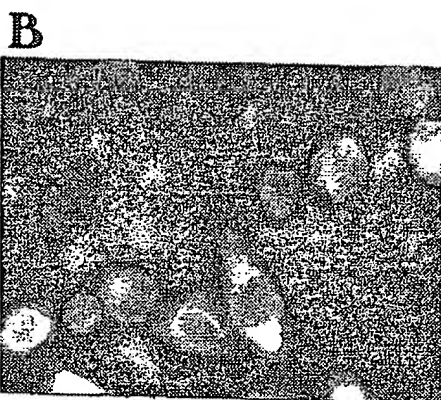
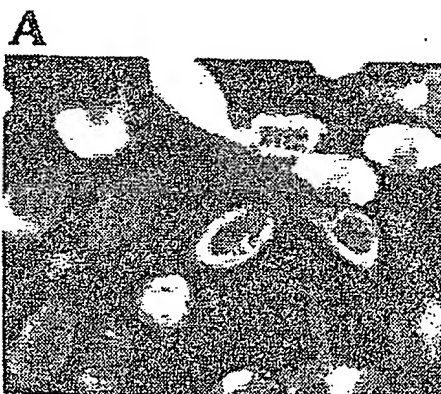
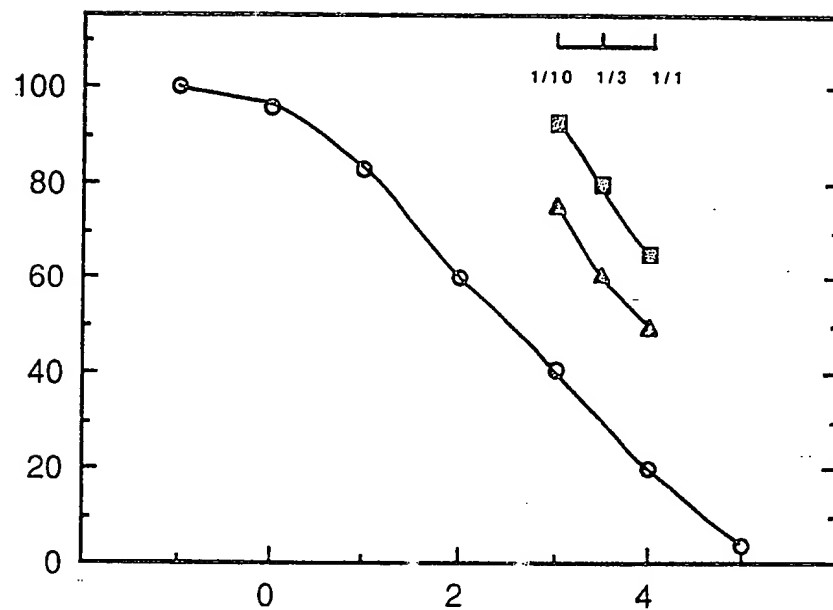


FIGURE 3

3 / 14

FIGURE 4

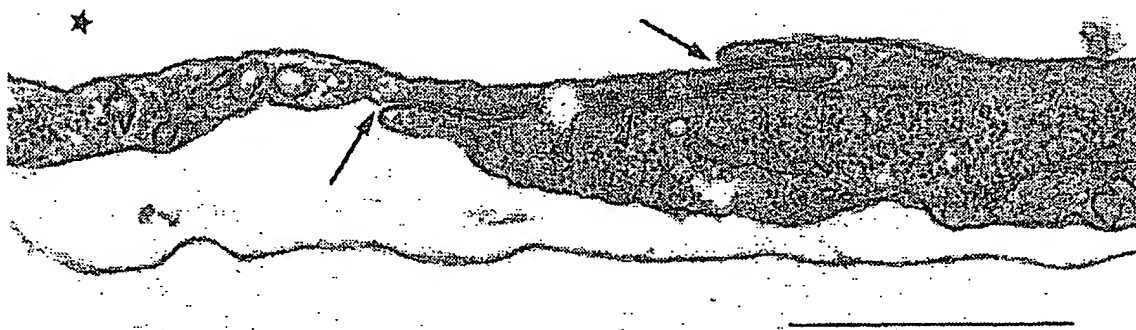
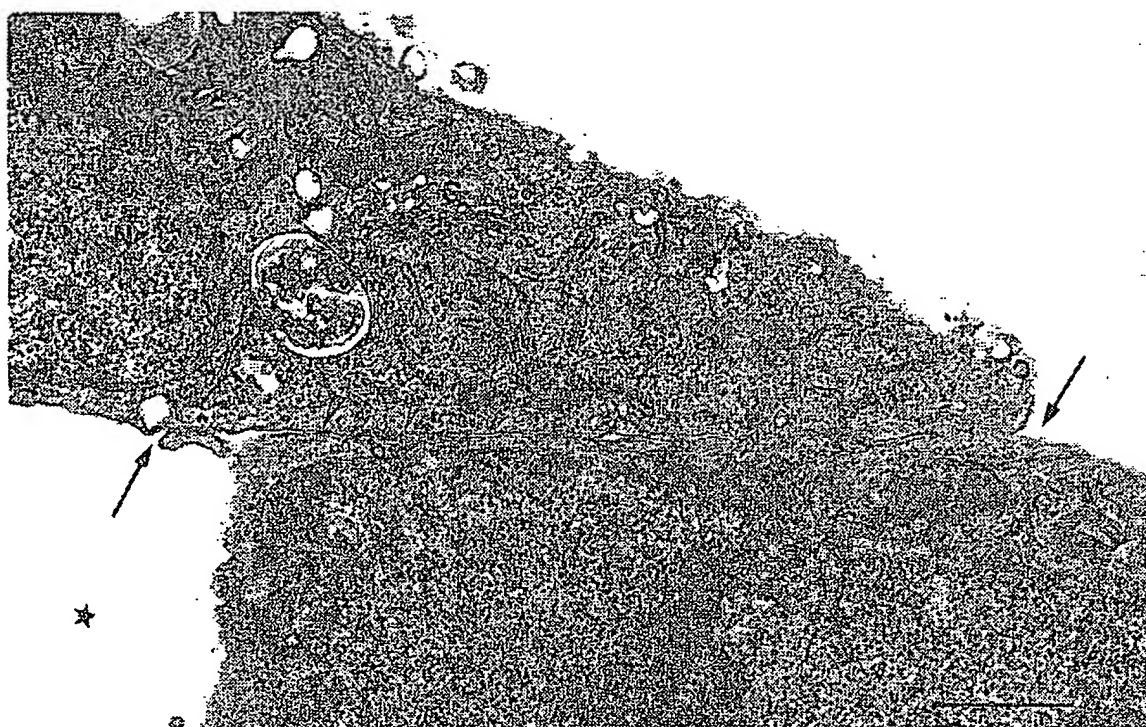


FIGURE 5

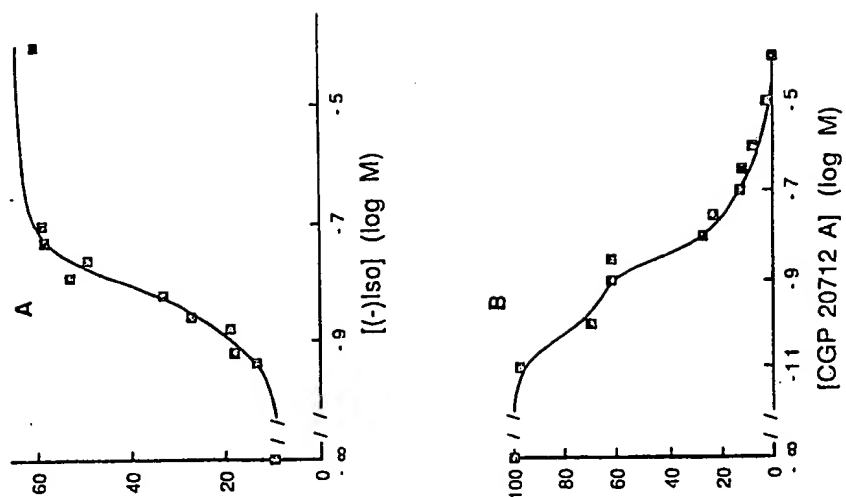


FIGURE 7

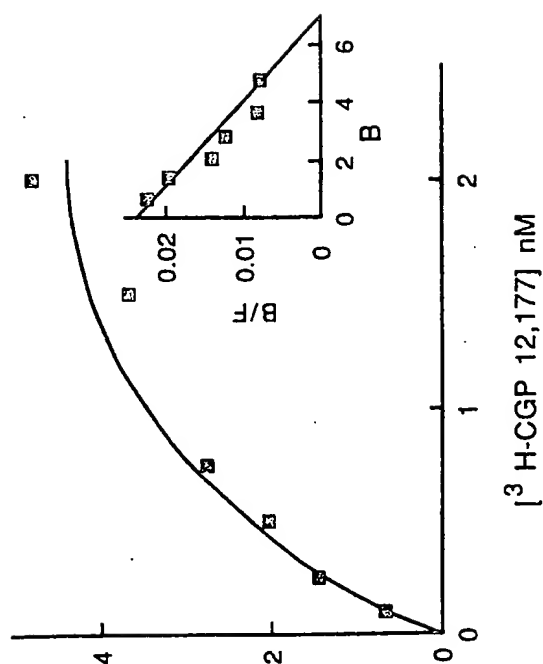


FIGURE 6

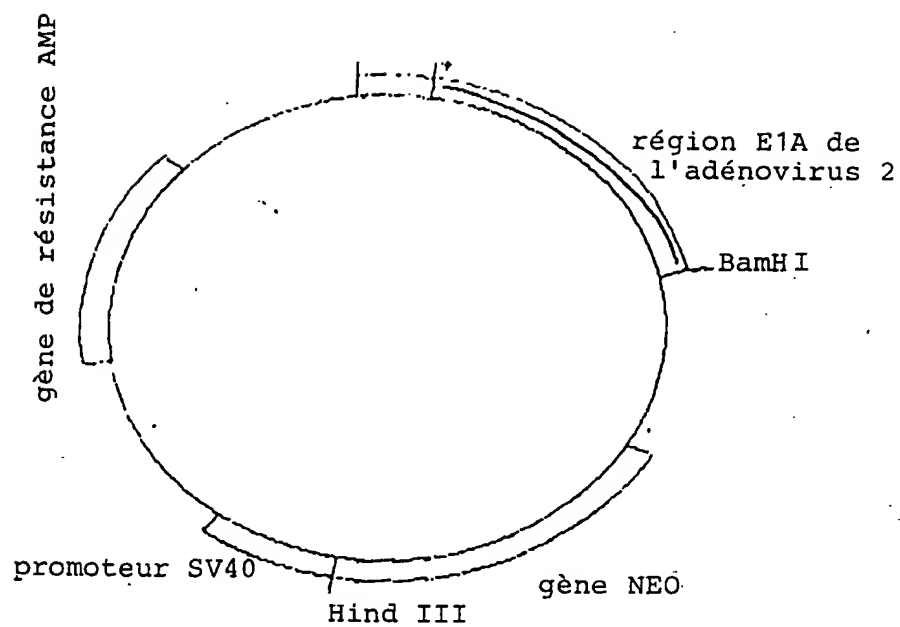


FIGURE 8

7/14

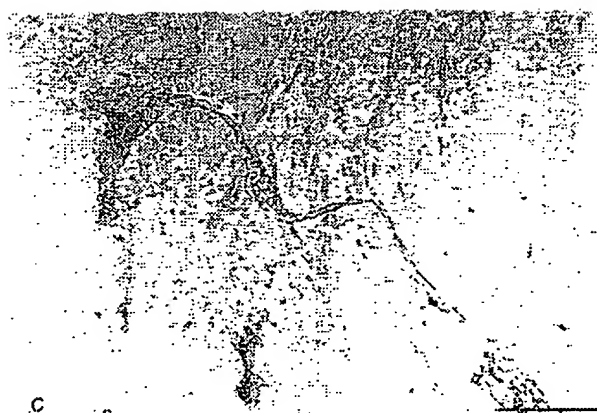


FIGURE 9 A-C

8/14



FIGURE 9 D-F

9/14

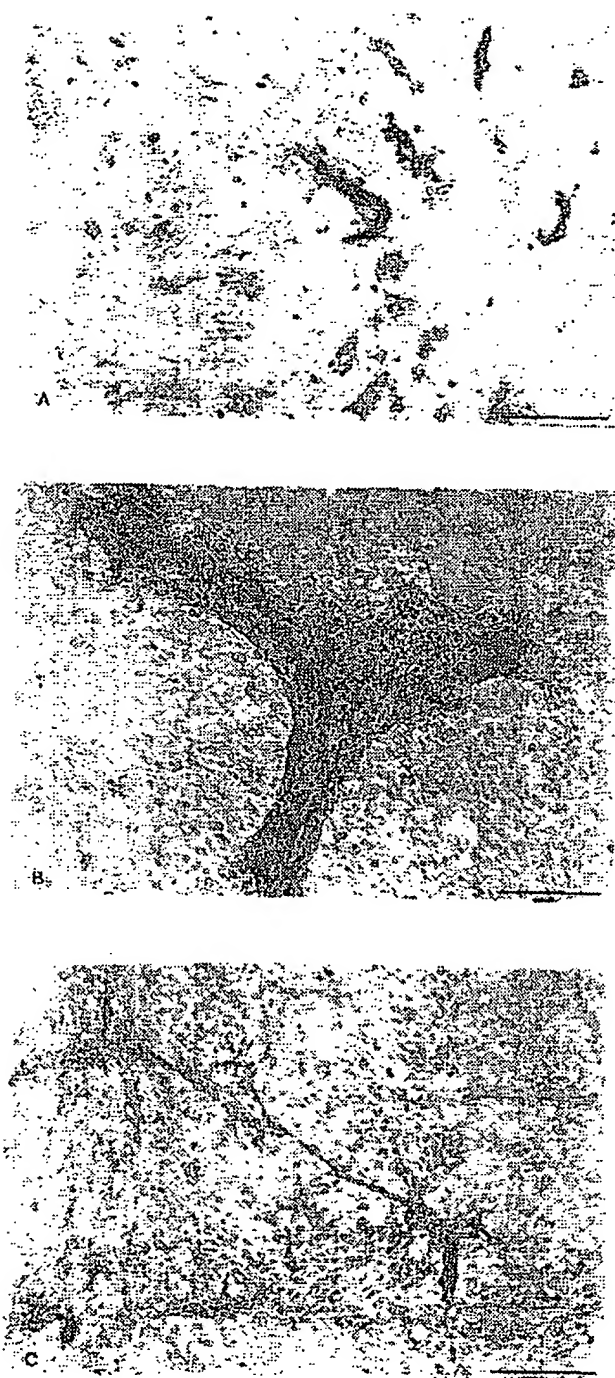


FIGURE 10 A-C

10/14

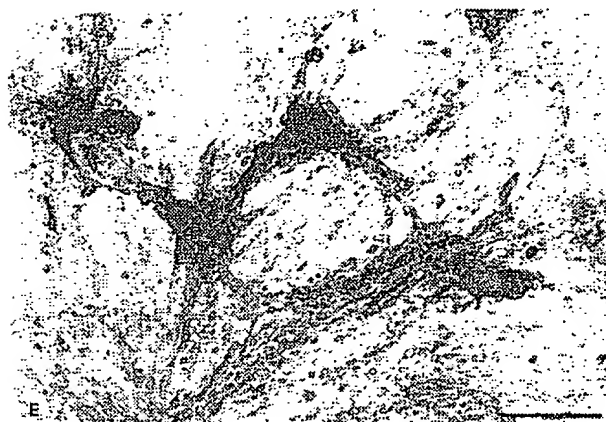
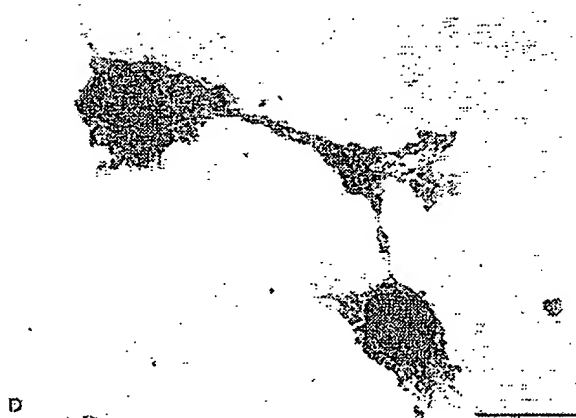
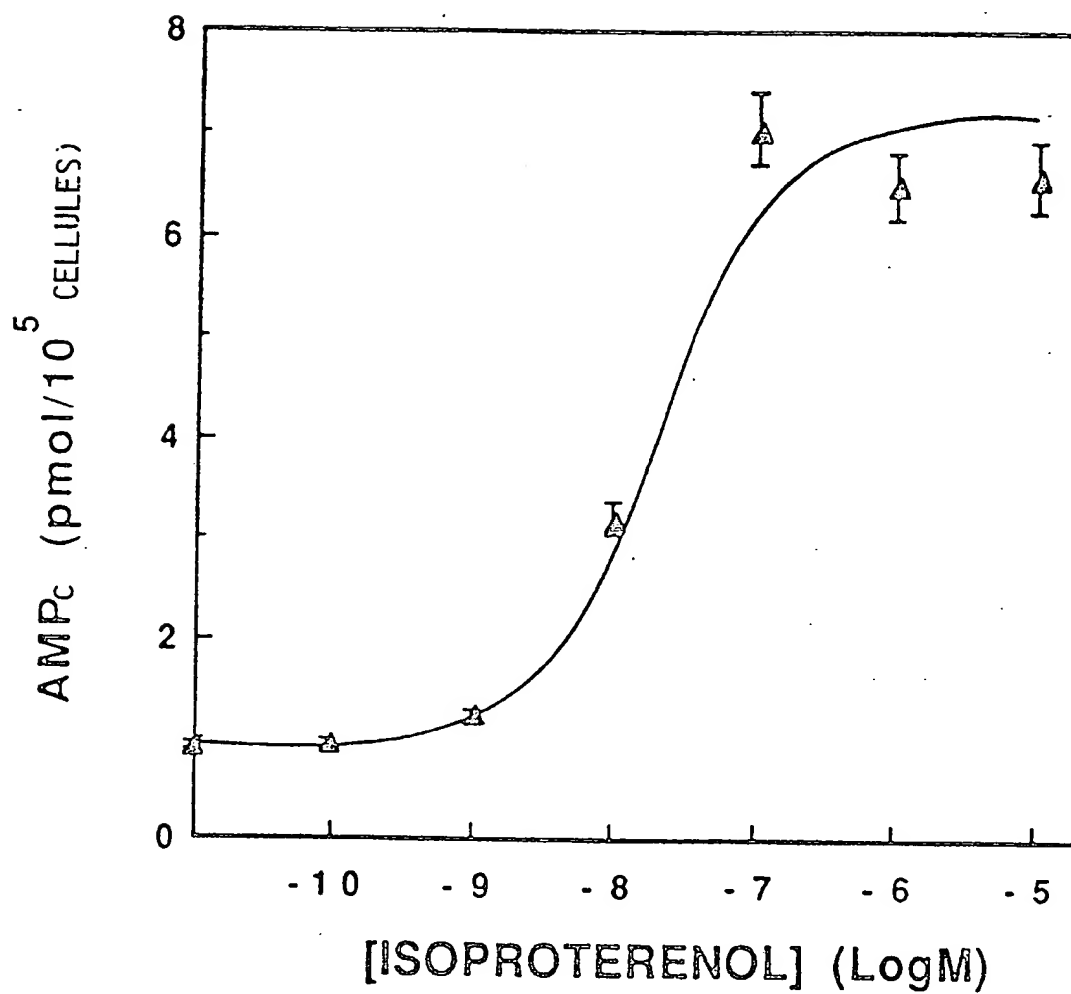
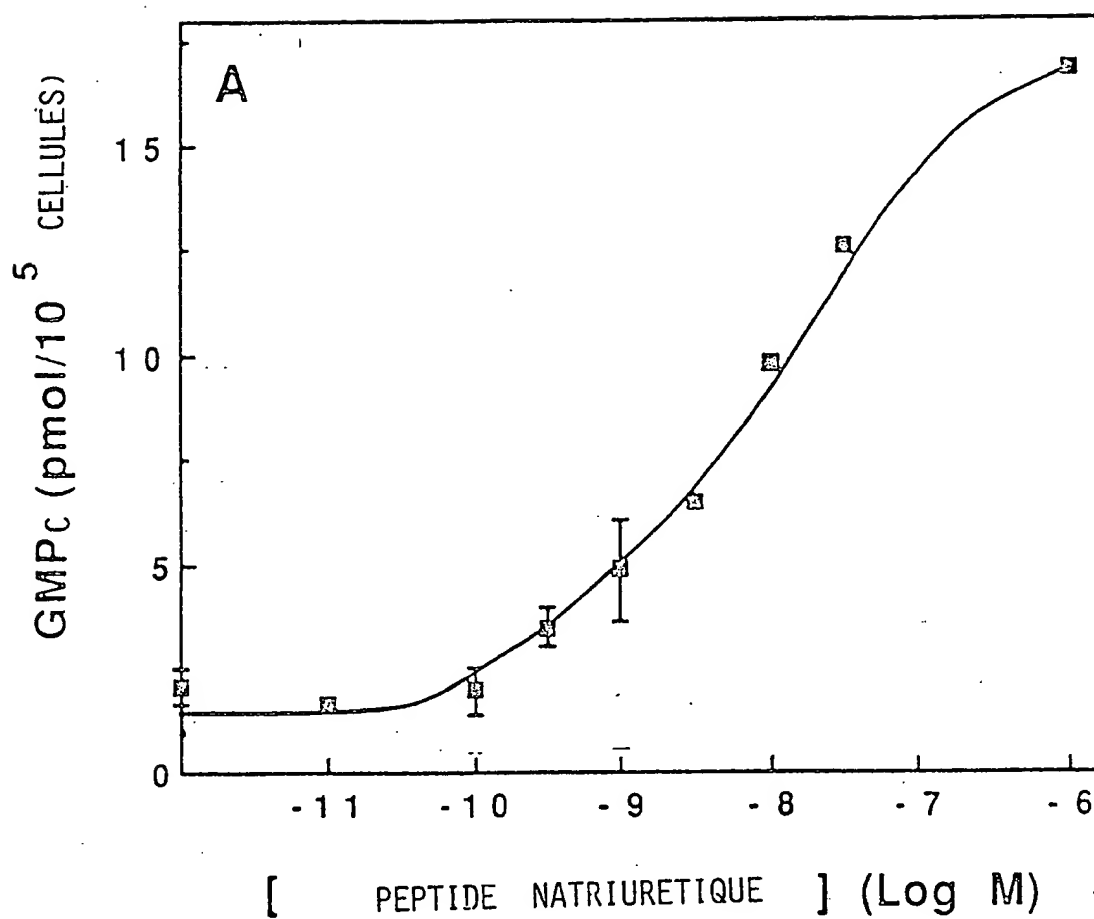


FIGURE 10 D-F

11/14

FIGURE 11

12/14

FIGURE 12

13/14

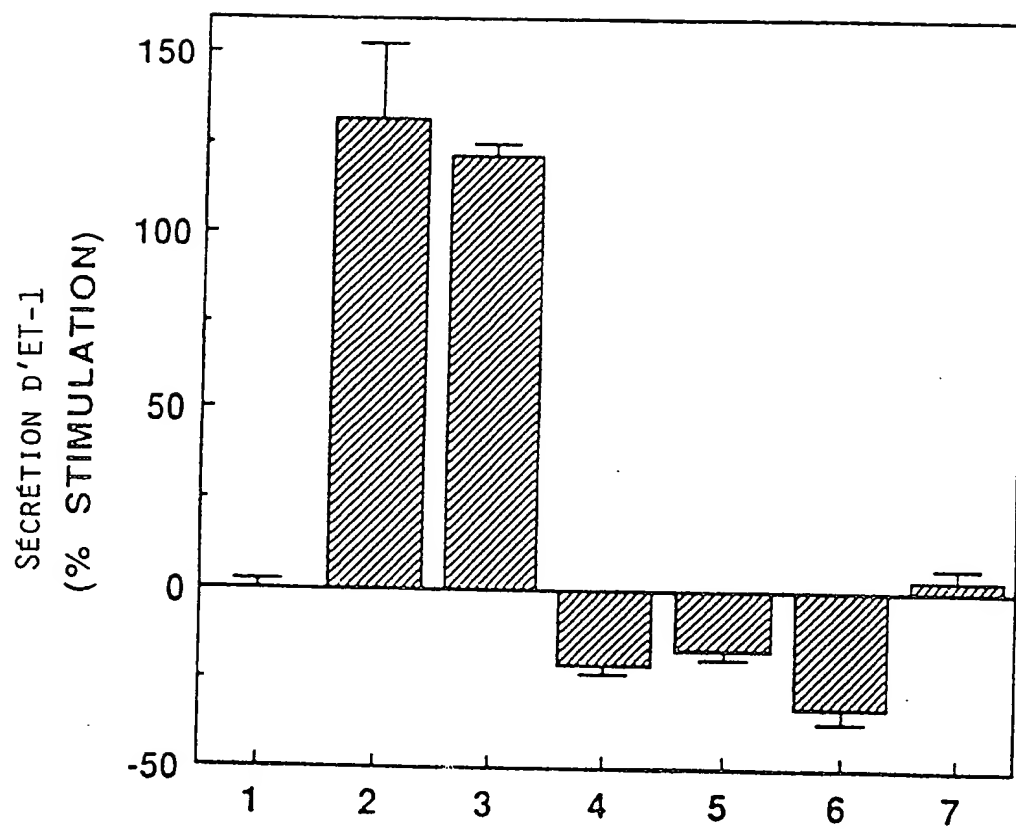
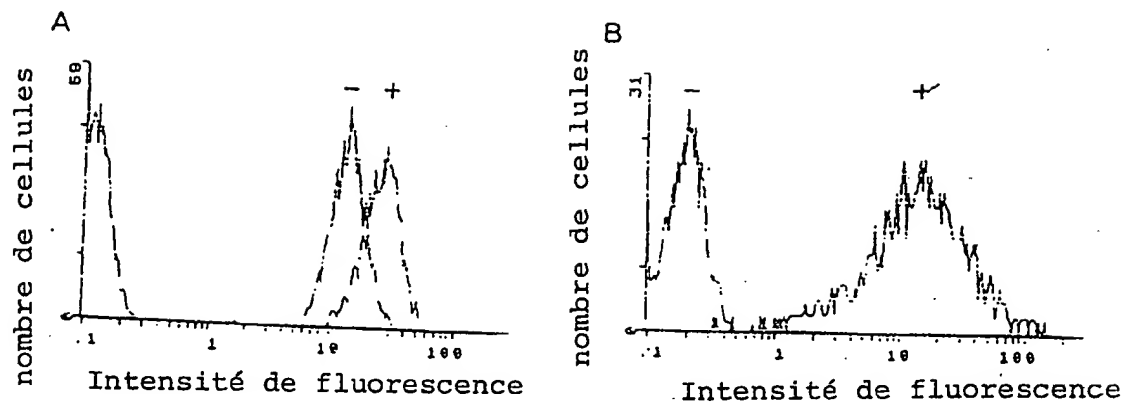


FIGURE 13

14/14

FIGURE 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl.5 C12N15/85; C12N5/10; C12N15/37; C12N15/34		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl.5 C12N; C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY Vol. 27A, No. 10, October 1991, pages 771- 778 DURIEU-TRAUTMANN, O. ET AL. 'Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium' see the whole document -----	1,2,6-9
P,X	WO, A, 9 210 563 (UNIVERSITE PARIS VII) 25 June 1992 see page 4, line 18 - line 22 see page 6, line 19; claims 1,2,5,12,14,15,17,20 ---	1,2,6-9
Y	FR, A, 2 634 784 (INSERM) 2 February 1990 see the whole document ----- -/-	1,2,4, 6-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 January 1993 (22.01.93)		12 February 1993 (12.02.93)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US-Published-Patent-Application-7-679674 (ADES, E.W., LAWLEY, T.J. & CANDAL, F.J.) (Publié dans NTIS GAZETTE le 1 Septembre 1991) see the whole document	1,6,7,8
Y	WO, A, 8 905 345 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15 June 1989 see the whole document	1,2,4, 6-8
Y	MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY Vol. 52, No. 3, August 1987, IRLANDE pages 279 -284 WHITLEY, G.S. ET AL. 'sght1-34, a thyrotrophin-responsive immortalised human thyroid cell line generated by transfection' cited in the application see the whole document	1,2,6,7, 8
Y	JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY Vol. 56, No. 3, 1991 pages 775-781 DURIEU-TRAUTMANN, O. ET AL. 'Coexpression of beta 1 and beta 2-adrenergic receptors on bovine brain capillary endothelial cells in culture' cited in the application see the whole document	1,2,6-8
L	CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 115, NO. 21, 25 November 1991, Columbus, Ohio, US; abstract No. 227832q "Immortalization of human endothelial cells and characterization of the immortalized cells" page 522; column 1; (publié trop tard; correspond à la publication dans NTIS gazette; cité pour prouver la date de mise à disposition du public) see abstract	1,6-8
L	WO, A, 9 217 569 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 15 October 1992 (publié trop tard mais correspond à la publication dans NTIS gazette de l'US- Published- Patent-Application-679674) see the whole document	1,6-8

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200879
SA 65328

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

22/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9210563	25-06-92	FR-A- 2670215	12-06-92
FR-A-2634784	02-02-90	None	
WO-A-8905345	15-06-89	EP-A- 0391960	17-10-90
		JP-T- 3505036	07-11-91
WO-A-9217569	15-10-92	None	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 92/00879

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/85;	C12N5/10;	C12N15/37; C12N15/34
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
P,X	IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY vol. 27A, no. 10, Octobre 1991, pages 771 - 778 DURIEU-TRAUTMANN, O. ET AL. 'Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium' voir le document en entier ---	1,2,6-9
P,X	WO,A,9 210 563 (UNIVERSITÉ PARIS VII) 25 Juin 1992 voir page 4, ligne 18 - ligne 22 voir page 6, ligne 19; revendications 1,2,5,12,14,15,17,20 ---	1,2,6-9
Y	FR,A,2 634 784 (INSERM) 2 Février 1990 voir le document en entier ---	1,2,4, 6-8
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
22 JANVIER 1993	12 02 93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	CHAM BONNET F.J.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁶			(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸	
Y	US-Published-Patent-Application-7-679674 (ADES, E.W., LAWLEY, T.J. & CANDAL, F.J.) (Publié dans NTIS GAZETTE le 1 Septembre 1991) voir le document en entier ---	1,6,7,8	
Y	WO,A,8 905 345 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15 Juin 1989 voir le document en entier ---	1,2,4,6-8	
Y	MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY vol. 52, no. 3, Août 1987, IRLANDE pages 279 - 284 WHITLEY, G.S. ET AL. 'sghtl-34, a thyrotrophin-responsive immortalised human thyroid cell line generated by transfection' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,6,7,8	
Y	JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY vol. 56, no. 3, 1991, pages 775 - 781 DURIEU-TRAUTMANN, O. ET AL. 'Coexpression of beta 1 and beta 2-adrenergic receptors on bovine brain capillary endothelial cells in culture' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,6-8	
L	CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 115, NO. 21, 25 Novembre 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 227832q, "Immortalization of human endothelial cells and characterization of the immortalized cells" " page 522 ; colonne 1 ; (publié trop tard; correspond à la publication dans NTIS gazette ; cité pour prouver la date de mise à disposition du public) voir abrégé ---	1,6-8	
L	WO,A,9 217 569 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 15 Octobre 1992 (publié trop tard mais correspond à la publication dans NTIS gazette de 1'US-Published-Patent-Application-679674) voir le document en entier -----	1,6-8	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200879
SA 65328

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

22/01/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9210563	25-06-92	FR-A- 2670215	12-06-92
FR-A-2634784	02-02-90	Aucun	
WO-A-8905345	15-06-89	EP-A- 0391960	17-10-90
		JP-T- 3505036	07-11-91
WO-A-9217569	15-10-92	Aucun	

EPO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

IMMORTALIZED CEREBRAL ENDOTHELIAL CELL LINES,
PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND APPLICATIONS
THEREOF AS A MODEL FOR THE STUDY OF CEREBRAL PHYSIOPATHOLOGY
[Lignees de cellules endothelials cerebrales
immortalisees avec un oncogene]

Michel Claire et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. October 1998

Translated by: Diplomatic Language Services, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(19): WO
DOCUMENT NUMBER	(11): 9306222
DOCUMENT KIND	(12): A1 (13):
PUBLICATION DATE	(43): 19930401
PUBLICATION DATE	(45):
APPLICATION NUMBER	(21): PCT/FR92/00879
APPLICATION DATE	(22): 19920922
ADDITION TO	(61):
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51): C12N 15/85; 5/10; 15/37; C12N 15/34
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):
PRIORITY COUNTRY	(33): FR
PRIORITY NUMBER	(31): 9111726
PRIORITY DATE	(32): 19910924
INVENTOR	(72): CLAIRE, MICHEL; COURAUD, PIERRE-OLIVIER; DURIEU-TRAUTMANN, ODILE; FOIGNANT-CHAVEROOT, NATHALIE; ROUX, FRANCOISE; STROSBERG, ARTHUR, DONNY
APPLICANT	(71): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
TITLE	(54): IMMORTALIZED CEREBRAL ENDOTHELIAL CELL LINES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND APPLICATIONS THEREOF AS A MODEL FOR THE STUDY OF CEREBRAL PHYSIOPATHOLOGY
FOREIGN TITLE	[54A]: LIGNEES DE CELLULES ENDOTHELIALS CEREBRALES IMMORTALISEES AVEC UN ONCOGENE

IMMORTALIZED CEREBRAL ENDOTHELIAL CELL LINES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND APPLICATIONS THEREOF AS A MODEL FOR THE STUDY OF CEREBRAL PHYSIOPATHOLOGY.

/1'

The present invention concerns immortalized cerebral endothelial cell lines, a process for their preparation, and applications thereof as a model for the study of cerebral physiopathology and, more specifically, as a cell model for the blood-brain barrier.

The blood-brain barrier controls exchanges between the blood and the cerebral parenchyma. It consists essentially of the endothelial cells of the cerebral microvessels associated with the perivascular astrocytes. These endothelial cells exhibit a unique phenotype characterized essentially by the presence of numerous close-knit intercellular junctions and the expression of specific enzymes such as γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) and alkaline phosphatase.

It is known that induction of this endothelial phenotype is controlled in vivo by the perivascular astrocytes. In vitro study of the molecular mechanisms of that induction is hindered by dependance on the availability of primary cell cultures of endothelial cells of cerebral microvessels; moreover, aside from the difficulty at the present time of having available systems permitting the analysis of endothelial cells of the blood-brain barrier, the limited life span of these cells in culture (on the order of 12 passages) leading, furthermore, to considerable phenotypic changes that are concomitant with aging of the cells (DURIEU-TRAUTMANN et al., J. Neurochem., 1991)

*Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

is another major problem associated with such studies.

Therefore, the objective of the inventors was to find a model for the study of endothelial cells of the blood-brain barrier presenting no hindrances to the culturing of these cells and allowing the study of the neuro- and immuno-chemical processes implicated in the control of the activity of the blood-brain barrier. /2

The object of the present invention is mammalian cerebral endothelial cell lines, characterized:

- by the fact that they are immortalized and exhibit at least one of the following characteristics of differentiated cerebral endothelial cells in a stable manner:

- the expression of endothelial markers such as the antigen related to factor VIII, the enzyme for the conversion of angiotensin and specific enzymes (γ -GT, alkaline phosphatase),

- the secretion of vasoactive substances (endothelin, NO, prostaglandins),

- the expression of molecules of the major histocompatibility complex (MHC),

- the expression of hormonal receptors (receptors for neurotransmitters such as the β -adrenergic receptors), and

- the existence of close-knit junctions, and

- by the fact that they can be obtained by transfection of cerebral endothelial cells by a nucleic acid fragment comprising at least one immortalizing fragment of a viral or cellular oncogene, possibly associated with at least one marker gene.

Such cell lines, surprisingly, exhibit at least one of the

aforementioned properties of differentiated cerebral endothelial cells, and do so in a stable manner.

In keeping with the invention, said marker gene is, to good advantage, a gene coding for resistance to an antibiotic.

According to an advantageous mode of implementing said line, it is obtained by transfection of endothelial cells of bovine cerebral capillaries by the neo pSV3 plasmid containing the neo gene for resistance to neomycin and a fragment of the T oncogene of SV40. /3

The neo pSV3 plasmid is described in greater detail in the article by Southern and Berg (J. Mol. Appl. Genet., 1982, 1, 327-341).

This cell line was given the name SV-BEC by the inventors.

In keeping with the invention, said line was filed under the number I-1143 on September 19, 1991 with the National Collection of Microorganism Cultures maintained by the Pasteur Institute.

According to another advantageous method of implementing said line, it is obtained by transfection of endothelial cells of the cerebral capillaries of the rat by a plasmid containing the precocious E1A region of the genome of the adenovirus 2 and the gene for resistance to neomycin.

This cell line has been named RBE-4 by the inventors.

In keeping with the invention, said line was filed under the number I-1142 on September 19, 1991 with the National Collection of Microorganism Cultures maintained by the Pasteur Institute.

Said viral or cell oncogene fragment and/or the marker gene are controlled either by a homologous promoter or a heterologous promoter which is apt to allow the expression of said immortalizing fragment.

In a manner that was not expected, said lines are immortal, exhibit a phenotype of differentiated cerebral endothelial cells that is stable and untransformed, possess unlimited proliferation activity, and exhibit certain properties of the cerebral endothelial cells of the blood-brain barrier, which, in particular, allow them to be used as an in vitro cell model of the blood-brain barrier. /4

The object of the present invention is also a process for obtaining a cell line according to the invention by a transfection method, whereby said process is characterized by the fact that:

- the cerebral microvessel endothelial cells are cultivated in a suitable culture medium, supplemented by serum and growth factor,
- they are transfected between the 2nd and 6th passage with a nucleic acid fragment comprising at least one immortalizing fragment of a viral or cell oncogene and possibly at least one marker gene, specifically a gene that codes for resistance to an antibiotic, and
- the cells that have been transfected are selected on a selection medium adapted to said marker gene, if necessary.

According to one advantageous embodiment of said process, said nucleic fragment includes one gene that codes for resistance to neomycin and one fragment of a viral oncogene, such as a fragment of the T oncogene of SV40 and a fragment containing the precocious E1A region of the genome of the adenovirus 2 or of a cell oncogene.

The object of the present invention is likewise a model for the study and identification of biochemical and cell systems of the blood-brain barrier, characterized by the fact that it includes at least one cell line according to the invention.

Aside from the preceding features, the invention has still other features that will become evident in the description to follow, which makes reference to examples of embodiments of the process that is the object of the present invention, referring to the diagrams in the attachments, where Figures 1 through 7 illustrate the properties of SV-BEC cells and Figures 8 through 14 illustrate the properties of RBE-4 /5 cells.

More precisely:

- Figures 1A and 1B show the effect of FGFb on the proliferation of SV-BEC cells (Figure 1A) and CECB cells (Figure 1B),

- Figures 2A and 2B show the effect of increasing amounts of FGFb on SV-BEC cells (Figure 2A) and CECB cells (Figure 2B),

- Figures 3 show that the SV-BEC cells are differentiated endothelial cells (Figure 3A: presence of the enzyme for angiotensin conversion; Figure 3B: presence of the antigen related to factor VIII; Figure 3C: immunocoloration with *Griffonia simplicifolia* agglutinin,

- Figure 4 shows that the SV-BEC cells secrete endothelin-1,

- Figure 5 shows a vertical section of a confluent monolayer of SV-BEC cells using electron microscopy,

- Figure 6 shows the number of β -adrenergic bonding sites that exist on the surface of the SV-BEC cells,

- Figures 7A and 7B show the effect of isoproterenol and an antagonist on the amount of AMPc in the SV-BEC cells,

- Figure 8 shows the structure of the plasmid serving the transfection of the endothelial cells of rat cerebral microvessels in order to obtain the immortalized RBE-4 line,

- Figures 9A and 9B show certain characteristics of the differentiated endothelial phenotype of the immortalized RBE-4 cells: expression of an antigen related to the factor related to factor VIII (Figure 9A) and staining by the *Bandeiraea simplicifolia* lectin (Figure 9B),

- Figures 9C through 9F show the histochemical localization of γ -GT in the presence of FGFb in the immortalized RBE-4 cells, /6

- Figures 10A-F show the histochemical localization of alkaline phosphatase in the absence (Figures 10A-B) or presence (Figures 10C-F) of FGFb,

- Figures 11 and 12 show the synthesis of AMPc (Figure 11) and of GMPc (Figure 12) by the RBE-4 cells,

- Figure 13 shows the secretion of ET-1 by the RBE-4 cells, and

- Figure 14 shows the expression of Class I and Class II MHC molecules in the RBE-4 cells.

It should be well understood, however, that these examples are provided solely by way of illustration of the object of the invention, without in any way limiting said object.

EXAMPLE 1: Preparation of a cell line according to the invention: endothelial cells of bovine cerebral microvessels (SV-BEC line).

Endothelial cells of bovine cerebral microvessels are isolated on the basis of cerebral cortex that has been treated with collagenase (DURIEU-TRAUTMANN et al., J. Neurochem., 1991, 56, 3, 775-781); these cells are not contaminated by smooth muscle vascular cells or pericytes. They are cultured in bottles with a 0.2% (p/v) gelatine covering that contains a DMEM medium (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented

by 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and 1 ng/ml FGFb and 1 g/l glucose.

They undergo a weekly passage carried out by a process of resuspension in trypsin-EDTA [0.05% - 0.02% (p/v)] at 1 to 10 dilutions; the medium is changed every 3 days.

The technique of calcium phosphate coprecipitation is used to transfect said cells at the 5th passage with neo pSV3 plasmid (10 μ g), containing a fragment of the SV40 oncogene and the neo gene for resistance to the medication called G418 (WHITLEY et al., Mol. Cell. Endocrinol., 1987, 52, 272-284).

Following selection in a medium containing 800 μ g/ml of G418, the existing cells are cloned by limit dilution.

In this manner, the SV-BEC clone is obtained.

EXAMPLE 2: Characteristics of the SV-BEC line.

The cell line obtained in Example 1 has a certain number of characteristics of cerebral endothelial cells.

A. Differentiated endothelial phenotype:

a) FGFb and gelatine needs of the immortalized SV-BEC cells:

- When the cells are sown at low density ($5 \cdot 10^3$ cells/cm²) in tissue culture bottles and cultivated on a medium supplemented by serum, [DMEM supplemented by fetal bovine serum (10%) and glutamine (2 mM)], the bovine cerebral endothelial cells (CECB) proliferate slowly, while the SV-BEC cells cease proliferation after 3-4 days in culture.

Figures 1A and 1B, on whose abscissa is found the number of days, with the number of cells/cm² ($\times 10^{-3}$) appearing on the ordinates, show the effect of the FGFb on the proliferation of SV-BEC cells (Figure 1A)

and CECB cells (Figure 1B). Adding FGFb (1 ng/ml) (Figure 1A, curve marked with squares, and Figure 1B, curve marked with triangles) considerably improves the growth rate of both cell types.

Confluence is achieved after 5 days, after adding FGFb every day.

• The maximum cell density obtained with the SV-BEC cells under these conditions is a mere 65 to 70% of the density obtained with the CECB cells. The growth rates of the two cell types are similar, requiring about 12 hours for the population to double, during the logarithmic phase. /8

• Figures 2A and 2B, where FGFb concentrations appear on the abscissa, with the number of cells/cm² ($\times 10^{-3}$) on the ordinates, show the effect of increasing amounts of FGFb on the SV-BEC cells (Figure 2A) and on CECB cells (Figure 2B) in the presence and absence of gelatine. The concentration of FGFb needed for optimal cell proliferation is 0.25 ng/ml for the SV-BEC cells (Figure 2A: culture bottles with gelatine covering: curve marked with dark squares; bottles without gelatine: curve marked with light squares) and 0.5 ng/ml for CECB cells (Figure 2B: culture bottles with gelatine covering: curve marked with dark triangles; bottles without gelatine: curve marked with light squares). In the test shown in Figures 2A and 2B, the FGFb is added on day 0 and day 3.

The proliferation responses of the two cell types are significantly improved when the cells are sown on culture bottles with gelatine coverings. At confluence, the SV-BEC cells form a monolayer of cells, inhibited by contact.

b) Immunochemistry:

Based on immunocytochemical analysis, the SV-BEC cells are found to express an antigen related to factor VIII as well as the enzyme of angiotensin conversion, two specific markers of endothelial cells.

In addition, these cells are stained by the fluorescent agglutinin *Griffonia simplicifolia* (Sigma), which is likewise a specific marker of cerebral endothelial cells.

For these three tests, the cells were cultivated on cover slips with a gelatine covering. They were fixated with a mixture of methanol:ethanol (1:1) at 22°C for 20 minutes after having been incubated first with antibodies directed against the antigen related to factor VIII or the angiotensin conversion enzyme, and then with biotinylated antibodies, and finally being stained with fluorescent streptavidine. These results are observed with the aid of a standard microscope (Nikon) equipped with illumination by epifluorescence. /s

The agglutinin *Griffonia simplicifolia*, marked with fluorescein, is used at 1/400 in a PBS buffer.

All incubations last 60 minutes at room temperature.

The SV-BEC cells are thus true differentiated endothelial cells, as evidenced by the presence of the antigen related to factor VIII (Figure 3B), the angiotensin conversion enzyme (Figure 3A), and the immunocoloration with the agglutinin *Griffonia simplicifolia* (Figure 3C).

c) Secretion of vasoactive substances:

The SV-BEC cells are also tested for the synthesis and secretion of vasoactive substances, as compared to the CECB cells. On the basis of

a radioimmunoassay, immunoreactivity related to that of endothelin-1 is detected in a conditioned medium (Figure 4). The dilution curves generated by these conditioned media are parallel to the standard curve obtained with endothelin-1 (ET-1). Furthermore, the observed secretion is a linear function of time, and reaches a plateau after 24 hours.

The RIA protocol is as follows:

/10

A rabbit antiserum that is specific for endothelin (final dilution of 1/300) is incubated in DMEM supplemented by fetal bovine serum (10%), in the presence of different concentrations of synthetic unmarked endothelin or a conditioned medium, for 2 hours at 37°C (final volume: 80 μ l).

Then [125 I]ET-1 (10,000 cpm in 40 μ l) is added with incubation lasting 16 hours at 4°C. The free and bonded [125 I]ET-1 are separated by adding protein A-Sepharose®.

After 1 hour at room temperature, the tubes are centrifuged, the caps are washed in a buffer, and the related radioactivity is measured.

Figure 4 shows the results of such an assay, where the concentration of endothelin-1 (log fmol/tube) appears on the abscissa, with the ratio of bonded/free (%) shown on the ordinates. The conditioned media obtained on the basis of SV-BEC (curve marked with dark squares) and CEBC (curve marked with dark triangles) are compared to the standard curve (curve marked with light circles).

B. Absence of tumorigenicity:

The SV-BEC cells are not transformed: in fact, as pointed out above, they exhibit contact inhibition and their proliferation depends on exogenous FGFb.

C. Expression of markers of the blood-brain barrier:

- The following protocol was used:

The cells are rinsed with a cold PBS buffer, pH 7.4, and then fixated in 2% (v/v) glutaraldehyde in a 0.1 M cacodylate buffer for 60 minutes at 4°C. After rapid rinsing in the same buffer, the cells are fixated once again, either in ferro-osmium [OsO₄ 1%, K₄Fe(CN)₆ 0.8%] in a cacodylate buffer for 30 minutes, or in 1% aqueous OsO₄ and 1% uranyl acetate in 50% ethanol.

These cells are then dehydrated in ethanol, and after that, re- /11
tracted from the culture bottles by means of a short treatment with butyl-2-3-epoxy-propyl ether.

The monolayers are carefully recovered and transferred onto small polyethylene capsules and enclosed in an EPON[®] mixture, using epoxy-1-2-propane as the intermediate solvent.

Fine sections are conventionally stained with lead citrate and uranyl acetate, and observed in a Philipps CM12 apparatus at 80 kv.

- Results:

The ultrastructural morphology of the SV-BEC cells is observed under an electron microscope.

Figure 5 shows a vertical section of a confluent monolayer; numerous close-knit intercellular junctions are visible (see arrows), a characteristic of the blood-brain barrier.

In addition, significant γ -glutamyl transferase activity is measured in the confluent SV-BEC cells (11.2 nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹), which is also characteristic of the blood-brain barrier, based on the protocol for measurement of γ -glutamyl transpeptidase described in ORLOWSKI and

MEISTER (Proc. Natl. Acad. Sci., 1970, 67, 1248-1255).

D. Coexpression of β 1- and β 2-adrenergic receptors:

* Bonding to the receptors.

- Protocol:

• In order to measure the bonding of β -adrenergic ligands, the cells are detached after a short treatment with EDTA trypsin, washed, and placed back into suspension (approximately 10^7 cells/ml) in a Hank saline solution supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.4, and bovine serum albumin (1 mg/ml).

The cells (10^6) are incubated in the buffer with increasing amounts of [3 H] CGP 12177, in a final volume of 300 μ l at 37°C for 60 minutes. /12

The non-specific bond is measured in the presence of (+) alprenolol $3 \cdot 10^{-5}$ M. The reaction is stopped by adding 1 ml of cold buffer, and the samples are immediately filtered through GF/C fiberglass filters (Whatman). After washings, the radioactivity retained in the filters is measured by liquid scintillation.

- Results:

The bonding of [3 H] CGP 12177, a hydrophilic β -adrenergic antagonist, is used to evaluate the number of β -adrenergic bonding sites present on the surface of the SV-BEC cells. A Scatchard analysis of the bonding data at saturation indicates 3819 ± 229 sites/cell and a dissociation constant (K_D) of 899 ± 113 pM (Figure 6).

Figure 6 has the concentration of [3 H] CGP 12177 on the abscissa in nM, with the bonded quantity of fpmol/ 10^6 cells on the ordinate.

* Coupling of receptors to adenylate cyclase activity: accumulation of

cell AMPc.

- Protocol:

Aliquots of 10^6 cells are incubated in a buffer (Hank saline solution, HEPES 20 mM, pH 7.4, IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine) 0.5 mM) with increasing amounts of (-)-isoproterenol, in a final volume of 200 μ l at 37°C for 10 minutes.

Inhibition of cell AMPc accumulation is tested with (-)-isoproterenol $3 \cdot 10^{-8}$ in the presence of different concentrations of β 1-selective adrenergic CGP 2071A ligand. The AMPc content is measured in the manner described by CHAPOT et al. (Hybridoma, 1989, 8, 535-543), using the Amersham [3 H] cAMP kit.

- Results:

/13

Figure 7A shows that the (-)-isoproterenol induces an increase in the level of AMPc by a factor of 6.

These data indicate an EC_{50} value of 5 nM for the (-)-isoproterenol. A biphasic inhibition of the effect of (-)-isoproterenol is observed in the presence of CGP 20712A, suggesting the existence of two populations of β -adrenergic receptors as in the original endothelial cells (Figure 7B).

A computerized analysis of these data reveals that 36% of the receptors have a strong affinity for CGP 20712A (IC_{50} = 29 pM), and that 65% have a weak affinity (IC_{50} = 1 nM). These values are consistent with the known affinities of CGP 20712A for the β 1- and β 2-adrenergic receptors (MARULLO et al., Bio/Technology, 1989, 7, 923-927).

Figure 7A, in which the abscissa shows the concentration of (-)-isoproterenol (log M) and the ordinate the quantity of pmol of AMPc/ 10^6

cells, illustrates the effect of isoproterenol on the quantity of AMPc in the SV-BEC cells, and Figure 7B, showing the concentration of CGP 20712A (log M) on the abscissa and the cumulative percentage of AMPc on the ordinate, illustrates the inhibition of this effect by the CGP 20712A.

EXAMPLE 3: Preparation of a cell line according to the invention: endothelial cells of cerebral microvessels of the Lewis rat (RBE-4 line).

- Endothelial cells of cerebral microvessels of the Lewis rat are immortalized by transfection with a plasmid containing the precocious E1A region of the genome of the adenovirus 2 and the gene for resistance to neomycin under the control of the SV40 promoter (Figure 8), according to the same technique as that used in Example 1 subsequent to having placed these cells for culturing in bottles with a collagen covering, containing an α -MEM/F10 (2/3; 1/3) medium, supplemented by fetal calf serum at 10%, 1 ng/ml FGFb, glutamin, and penicillin/streptomycin. /14

EXAMPLE 4: Characteristics of the RBE-4 line.

The cell line obtained in Example 3 has certain characteristics of cerebral endothelial cells studied according to the same protocols as those used in Example 2; in particular, it has a non-transformed phenotype: contact inhibition, proliferation depending on factors of growth and adherence, the expression of markers of endothelial differentiation, and non-tumorigenicity.

A. Differentiated endothelial phenotype:

The RBE-4 cells express an antigen related to the factor related to factor VIII (Figure 9A); furthermore, these cells are stained by the

lectin *Bandeiraea simplicifolia* (Figure 9B); the protocol used is the same as that in Example 2 and the results clearly show that the RBE-4 cells are differentiated endothelial cells.

B. Expression of markers of the blood-brain barrier:

The activities of two enzymes considered to be markers of differentiated endothelial cells of cerebral microvessels, i.e., γ -glutamyl transferase (γ -GT) and alkaline phosphatase, are evident in the RBE-4 cells using histochemical methods.

The RBE-4 cells are sown in tissue culturing bottles and cultivated in a medium containing FGFb [α Medium/Ham's F10 (1:1 Seromed, France), supplemented by 2 mM glutamin, 10% fetal calf serum inactivated by heat, and 1 ng/ml FGFb; then they are spread out to a density of 10^4 cells/cm² on bottles with a collagen covering]. After several days, the confluent cultures develop ramifications extending beyond the monolayer and form a network of tubular structures reminiscent of capillaries (Figure 9C). /15 Activities of γ -GT (Figure 9C) and alkaline phosphatase can be detected in some of these tubular structures, but are not observed in the surrounding monolayer.

The RBE-4 cells are co-cultivated with a conditioned medium or plasmatic membranes, either of primary astroglial cells of the rat (Figure 9D) or of C6 gliomal cells (Figure 9E). In the monolayers treated with the two aforementioned types of plasmatic membranes, whether or not FGFb is present, the tubular structures develop rapidly and form large amorphous aggregates; such proliferation is less evident in the conditioned medium. γ -GT (Figure 9F) and alkaline phosphatase (Figure 10A-F) activities are encountered in numerous cells of these

three-dimensional structures, leading to a global augmentation of these two markers of the BHE in the co-cultures. The addition of an analog of AMPc, 8-bromo-AMPc, decreases this angiogenic process and induces the expression of alkaline phosphatase activity in each of the cells forming the residual tubular structures or the aggregates, and in some cells of the monolayer. The effects of this substance on γ -GT are less pronounced.

Figures 9C through 9F illustrate the histochemical localization of γ -GT in the presence of FGFb (one dash corresponds to 60 μ m): 9C: RBE-4 cells at confluence, with a capillary-type structure and the presence of some γ -GT + cells; 9D: RBE-4 cells treated for 6 days with plasmatic membranes of primary astrocytes; 9E: RBE-4 cells treated for 6 days with plasmatic membranes of C6 gliomal cells; 9F: RBE-4 cells treated for 6 days with plasmatic membranes of C6 gliomal cells and 0.1 mM 8-bromo-AMPc: most of the cells exhibit γ -GT activity.

/16

Figures 10A-F show the histochemical localization of alkaline phosphatase in the absence (Figures 10A-B) or presence (Figures 10C-F) of FGFb: Figures 10A and C: RBE-4 cells at confluence; Figures 10B and D: RBE-4 cells treated for 6 days with plasmatic membranes of C6 gliomal cells; Figure 10E: RBE-4 cells treated for 10 days with a conditioned medium for C6 gliomal cells; Figure 10F: cells treated additionally with 0.1 mM 8-bromo-AMPc. These different figures show that the expression of the alkaline phosphatase activity takes the same course in co-culture and in the presence of 8-bromo-AMPc as does γ -GT.

These different results show that in the monolayers of endothelial cells of the RBE-4 clone, as in the primary cultures of microvascular

endothelial cells, the formation of capillary tubes takes place in the presence of a soluble angiogenic mitogen; furthermore, the formation of such a tubular structure can be stimulated by astroglial factors (membranous or soluble).

C. Expression of hormonal receptors.

- Production of AMPc:

Aliquots of $4 \cdot 10^6$ cells are incubated in a buffer A (Hank saline solution, Hepes 20 mM pH 7.4, IBMX 0.5 mM) in the presence of increasing quantities of (-)-isoproterenol, in a final volume of 250 μ l at 37°C for 10 minutes; the AMPc is measured as described in DURIEU-TRAUTMANN O. et al. (J. Neurochem., 1991, 56, 775-781), using an Amersham [3 H] AMPc kit.

The RBE-4 cells had been tested for their ability to produce AMPc under the influence of an extracellular regulating signal; Figure 11, showing the concentration of isoproterenol on the abscissa and the concentration of AMPc (pmol/ 10^5 cells) on the ordinate, shows that isopro- /1: terenol, a β -adrenergic agonist, stimulates the accumulation of AMPc in the RBE-4 cells, with said stimulation being blocked by propranolol.

- Production of GMPc:

Aliquots of $2 \cdot 10^5$ cells are incubated in the same buffer A as above in the presence of increasing quantities of natriuretic peptides (ANP), in a final volume of 500 μ l at 37°C for 10 minutes.

At the time of testing for soluble guanylyl cyclase activity, aliquots of 10^6 cells are incubated in buffer A containing nitroprusside at 37°C for 5 minutes.

Production of GMPc on the basis of GTP is catalyzed by various enzymes: Figure 12, showing the concentration of ANP on the abscissa and

the ET-1 immunoreactivity in the supernatants is measured. The results are expressed as the mean \pm SEM from 8 to 16 measurements ($p < 0.01$ for columns 2 to 6).

- Secretion of NO:

NO, identified as a relaxing factor of the endothelium, is synthesized on the basis of L-arginine by at least two different NO synthases (the first, depending on calcium and calmodulin and expressed in a constitutive manner in only a small number of cell types, including some neurons; the second, inducible by cytokines).

The RBE-4 cells are cultivated in bottles with 24 wells for 3 days.

They are then stimulated by adding 100 U/ml of IFN- γ of the rat and/or 50 U/ml of human TNF α in the presence or absence of the various effectors mentioned below: N-methylarginine (NMA), nitro-arginine (NOA), cycloheximide (CHX), 8-bromo-AMPC (BrAMPC), or isoproterenol (ISO).

Table I below shows regulation of the activity of NO synthase which is inducible in the RBE-4 cells.

/19

Treatment	Nitrite accumulation (μM)
None	<0.5
IFN	3.1 ± 0.1
TFN	<0.5
ISO (100 μm)	<0.5
TFN + IFN	10.0 ± 0.1
TFN + IFN + NMA (100 μm)	1.7 ± 0.1
TFN + IFN + NOA (100 μm)	7.6 ± 0.4
TFN + IFN + CHX (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	1.2 ± 0.2
IFN + Br - AMPc (500 μm)	3.8 ± 0.1
TFN + IFN + Br - AMPc (500 μm)	15.0 ± 0.4
IFN + ISO (10 μm)	3.9 ± 0.1
IFN + ISO (100 μm)	4.2 ± 0.1
TFN + IFN + ISO (100 μm)	14.8 ± 0.7

Release of NO by the RBE-4 cells is detected by a colorimetric determination of the accumulated nitrites after 48 hours, by adding 500 μl of cell supernatant to 500 μl of Greiss reagent (0.5% sulfanilamide and 0.05% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid), followed by incubation for 10 minutes at room temperature. The DO_{540} is measured with a spectrophotometer. As shown by Table I, only the inducible NO synthase can be detected in the RBE-4 cells. The production of nitrites by RBE-4 cells is induced by treatment with IFN- γ , and TFN α enhances this effect. This activity is blocked by N-methyl arginine and, to a lesser degree, by nitro-arginine. This shows the absence of the expression of constitutive NO synthase by these cells,

which would represent a unique characteristic of endothelial cells of the blood-brain barrier.

Table I also shows that BrAMPc, although devoid of any effect on its own, enhances the inductive effect of cytokines.

Isoproterenol stimulates the inductive effect of IFN- γ and TNF α , /20 although it has no effect on its own.

The activity of isoproterenol is dose dependent and resembles that of 8-Br-AMPc.

Activation of NO synthesis is preceded by a 7-8 hour lag phase.

- Secretion of prostaglandins:

RBE-4 cells secrete large amounts of PGE₂ in a constitutive manner (>1000 pg/ml), but practically no 6-ceto-PGF_{1 α} , which is the stable derivative of PGI₂ (<50 pg/ml).

E. Expression of molecules of the major complex of histocompatibility.

Expression of Class I and Class II molecules in RBE-4 cells was studied.

By cytometric analysis of flux under standard conditions, the RBE-4 cells express solely Class I molecules in a constitutive manner. An analysis following treatment with IFN- γ revealed that the expression of Class I molecules was augmented; it showed, furthermore, a strong induction of the expression of Class II molecules (Figure 14: intensity of fluorescence on the abscissa and number of cells on the ordinate): the maximum expression of Class I molecules is observed after 16 hours and remains stable for several hours, whereas 24 hours of treatment are required to obtain an optimal expression of Class II molecules.

As follows from the above, the invention is in no way limited to

these methods of implementation, execution, and application that have just been described in rather explicit detail; on the contrary, it encompasses all variants that may occur to the mind of a technician in the subject without going beyond the framework or reach of the present invention.

[Optional page concerning the microorganism mentioned on page 3, line 12 of the original, indicating address of the institutional depository] /21

[Optional page concerning the microorganism mentioned on page 3, line 24 of the original, indicating address of the institutional depository] /22

CLAIMS

/23

1) Mammalian cerebral endothelial cell lines, characterized by the fact that:

- they are immortalized and exhibit at least one of the following characteristics of differentiated cerebral endothelial cells in a stable manner:

- the expression of endothelial markers,
- the secretion of vasoactive substances,
- the expression of molecules of the major histocompatibility complex (MHC),
- the expression of hormonal receptors, and
- the existence of close-knit junctions, and

- they can be obtained by transfection of cerebral endothelial cells by a fragment of nucleic acid containing at least one immortalizing

fragment of a viral or cell oncogene, possibly associated with at least one marker gene.

2) A cell line according to Claim 1, characterized by the fact that it can be obtained by transfection of endothelial cells of bovine cerebral capillaries by neo pSV3 plasmid containing the neo gene for resistance to neomycin and a fragment of the T oncogene of SV40.

3) A cell line according to Claim 2, characterized by the fact that it has been placed in the depository under the number I-1143 on September 19, 1991 at the National Collection of Microorganism Cultures maintained by the Pasteur Institute.

4) A cell line according to Claim 1, characterized by the fact that it can be obtained by transfection of endothelial cells of cerebral capillaries of the rat by a plasmid containing the precocious E1A region of the genome of the adenovirus 2 and the gene for resistance to neomycin.

5) A cell line according to Claim 4, characterized by the fact that it was placed in the depository under the number I-1142 on September 19, 1991 at the National Collection of Microorganism Cultures maintained by the Pasteur Institute. /24

6) A process for obtaining a cell line according to any of Claims 1 through 5 by a method of transfection, said process being characterized by the fact that:

- endothelial cells of the cerebral microvessels are cultivated in a suitable culture medium, supplemented by serum and growth factor,
- they are transfected between the 2nd and 6th passage with a fragment of nucleic acid containing at least one immortalizing fragment

of a viral or cell oncogene and possibly at least one marker gene, in particular a gene coding for resistance to an antibiotic, and

- the transfected cells are selected on a selection medium that is adapted to said marker gene, if necessary.

7) A process according to Claim 6, characterized by the fact that said nucleic fragment contains a gene coding for resistance to neomycin and a fragment of a viral or cell oncogene.

8) A process according to Claim 7, characterized by the fact that the fragment of the viral oncogene is chosen from the group containing fragments of the T oncogene of SV40 and fragments containing the precocious E1A region of the genome of the adenovirus 2.

9) A model for the study and identification of biochemical and cellular systems of the blood-brain barrier, characterized by the fact that it contains at least one cell line according to any of Claims 1 through 5.

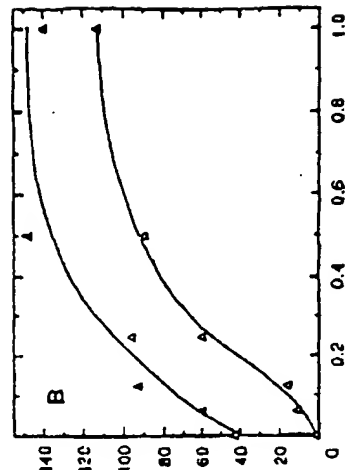
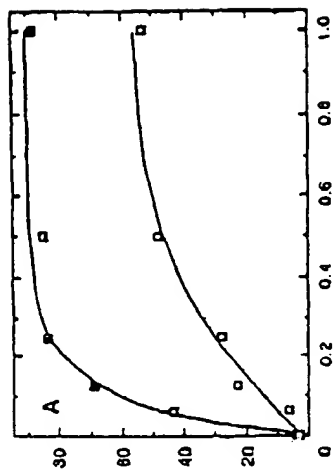


FIGURE 2

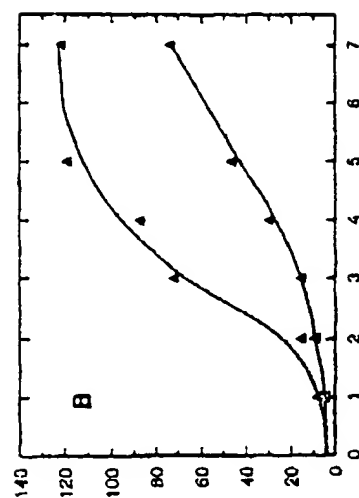
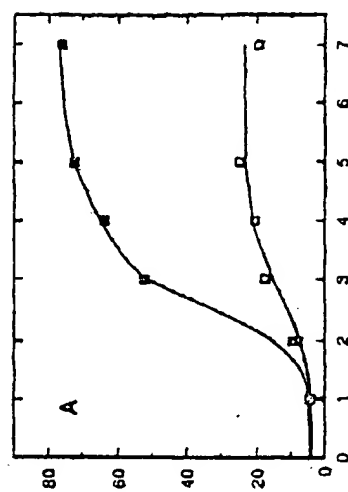
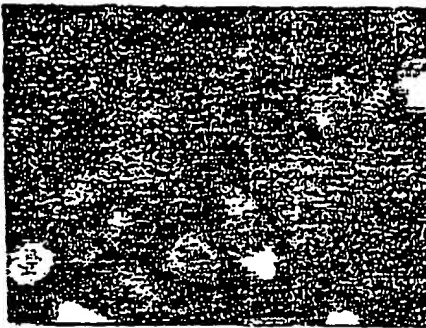


FIGURE 1

A



B



C



FIGURE 3

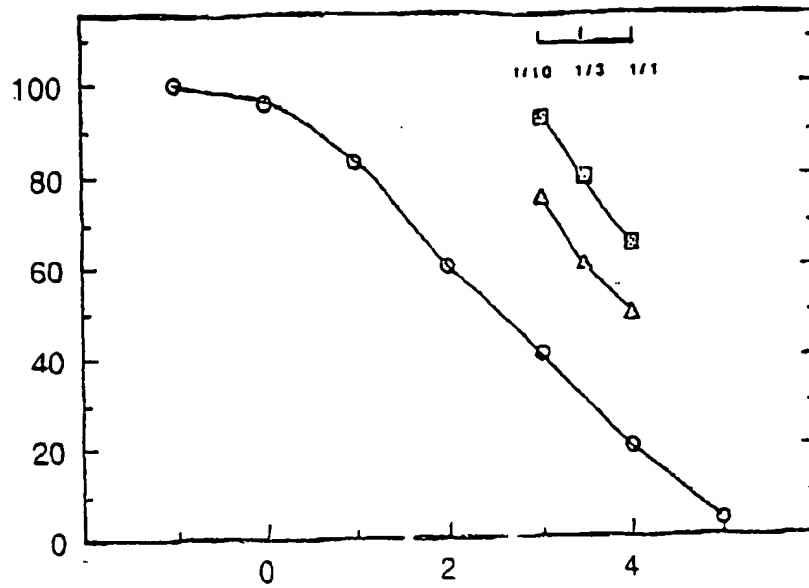


FIGURE 4

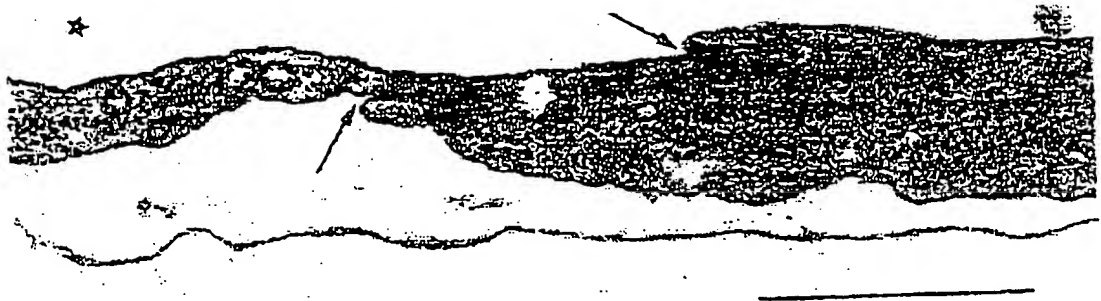
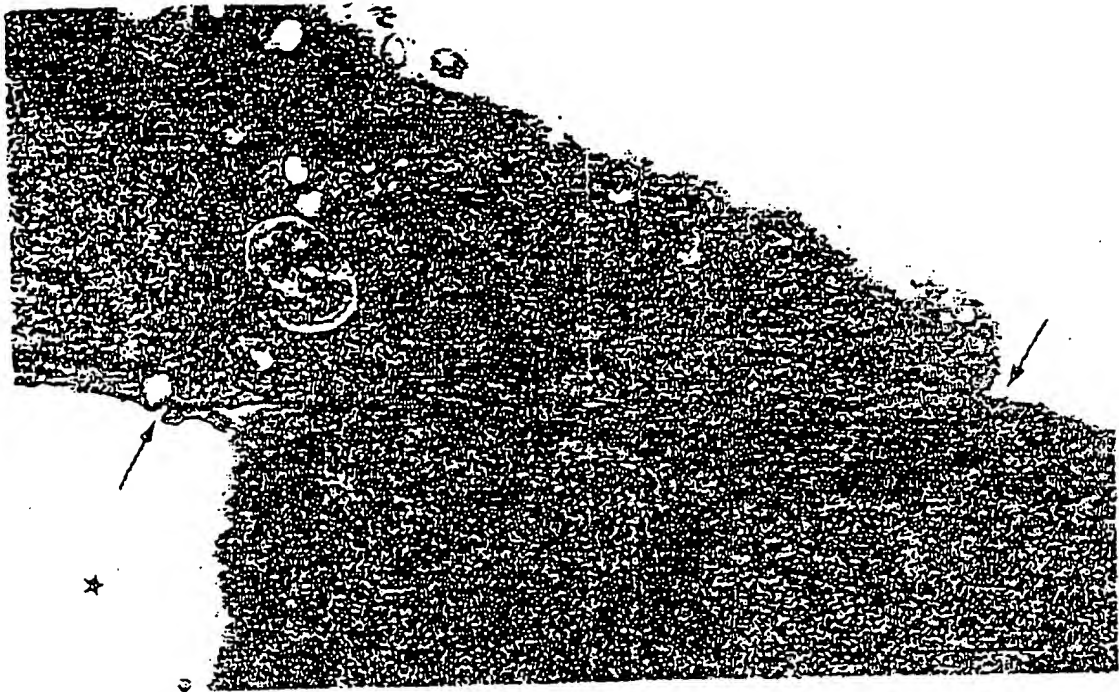


FIGURE 5

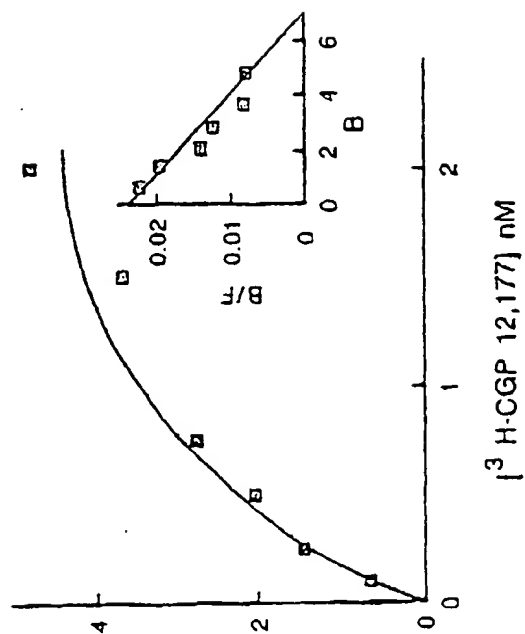


FIGURE 6

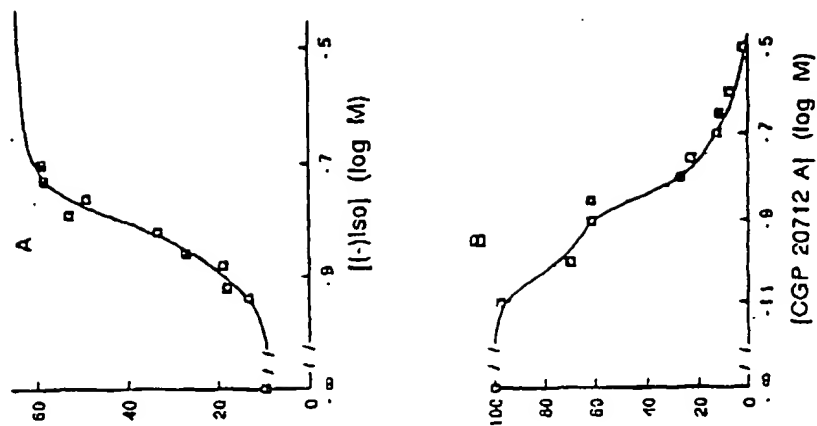


FIGURE 7

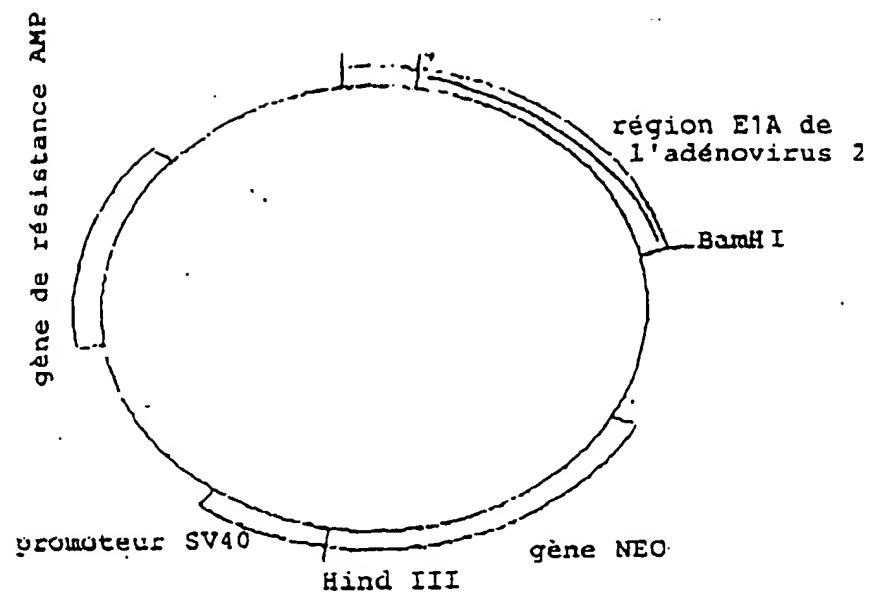


FIGURE 8

gène de résistance AMP = AMP gene for resistance
 région E1A de l'adénovirus 2 = E1A region of the adenovirus 2
 promoteur SV40 = SV40 promoter
 gène NEO = NEO gene



FIGURE 9 A-C



FIGURE 9 D-P

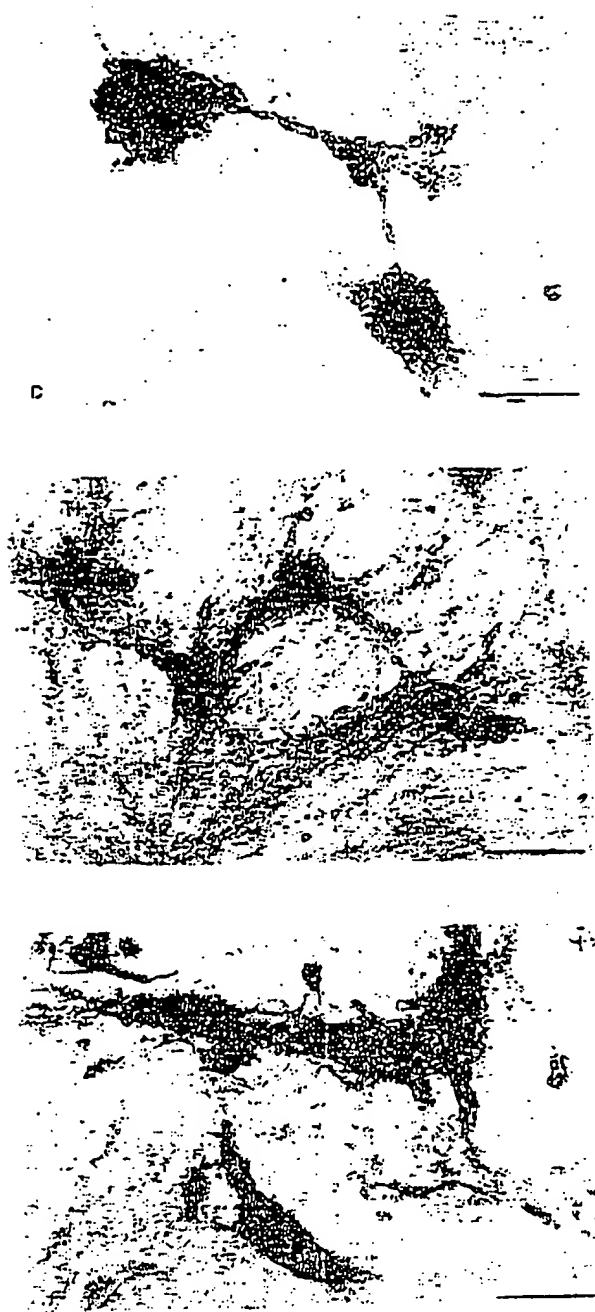
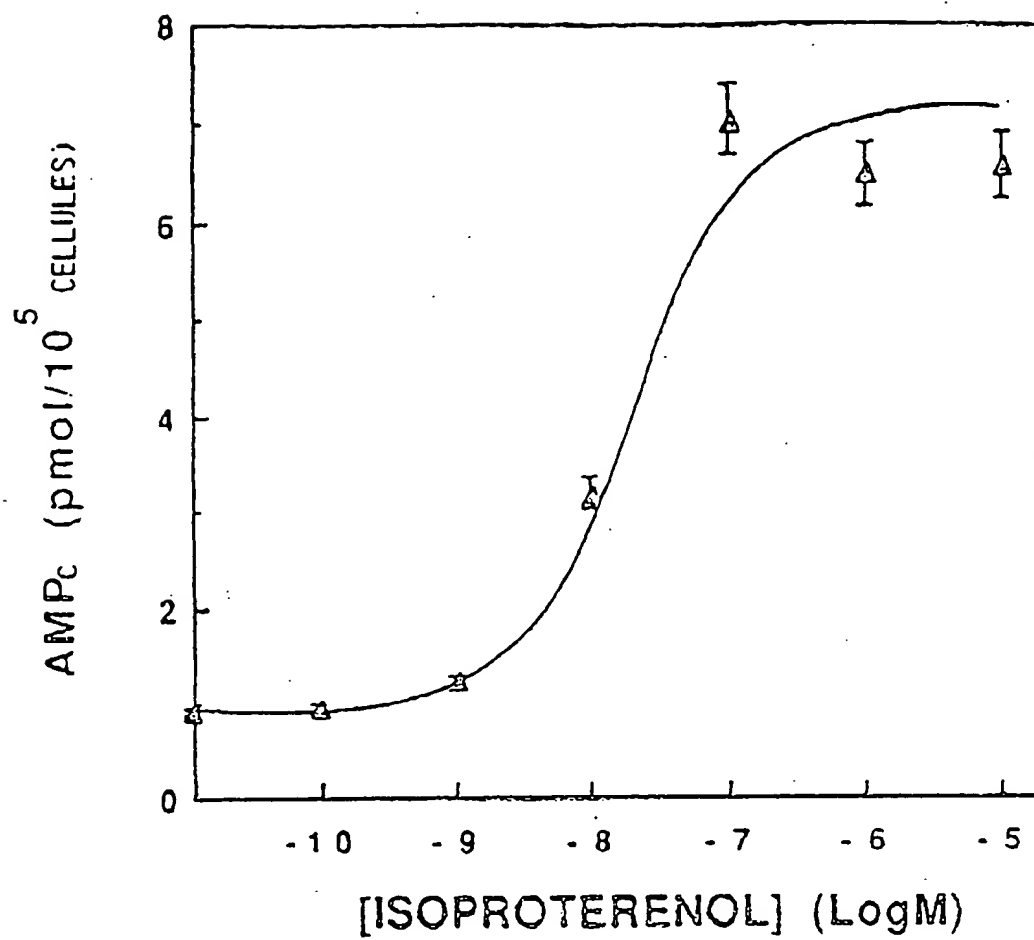


FIGURE 10 D-F



cellules = cells

FIGURE 11

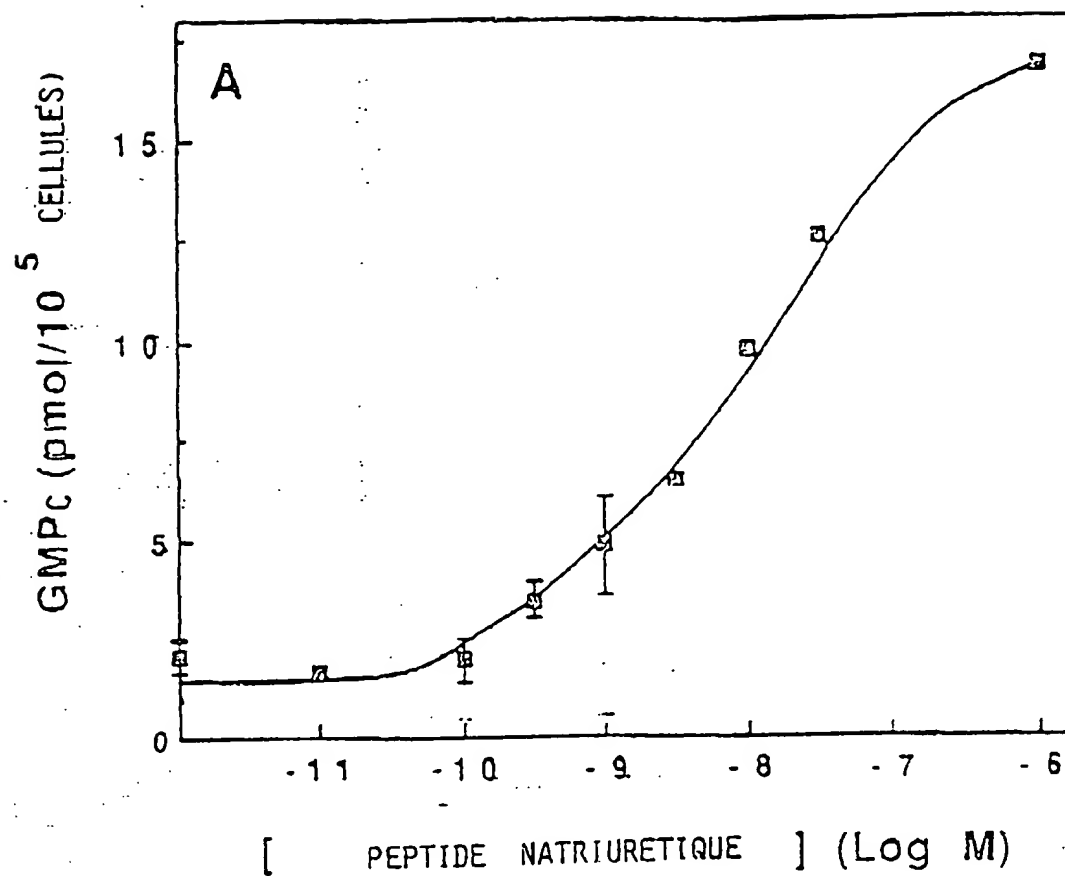


FIGURE 12

cellules = cells

peptide natriuretique = natriuretic peptide

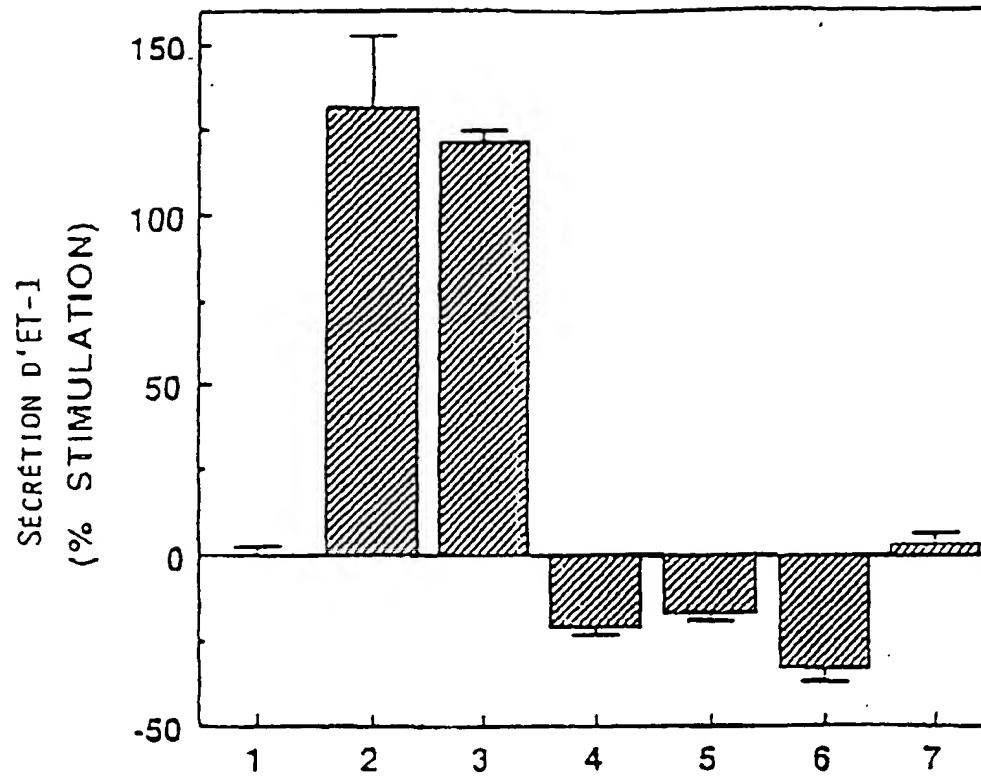


FIGURE 13

sécrétion d'ET-1 = secretion of ET-1

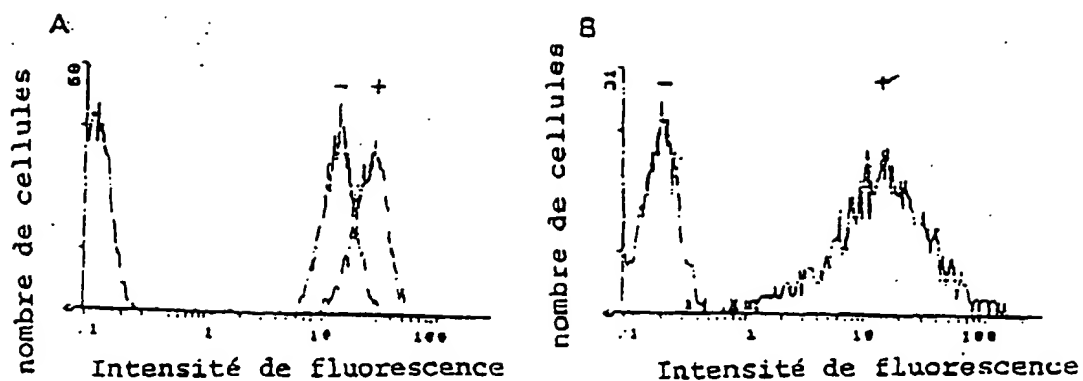


FIGURE 14

nombre de cellules = number of cells
 Intensité de fluorescence = intensity of fluorescence